

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. März 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/023023 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 5/08
5/10, A61K 35/28
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09260
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. August 2002 (19.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 39 428.4 17. August 2001 (17.08.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NEMOD IMMUNOTHERAPIE AG [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GOLETZ, Steffen [DE/DE]; Triftstrasse 15b, 13129 Berlin-Blankenburg (DE); SCHEPER, Rik, J. [NL/NL]; Jokerstraat 19-2, NL-1078 LW Amsterdam (NL); MASTERSON, Alan [IE/NL]; Crijnsenstraat 51 huis, NL-1058 XV Amsterdam (NL); PINEDO, Herbert, M. [NL/NL]; Jan van Goyenkade 18, NL-1075 HR Amsterdam (NL).
- (74) Anwalt: VOSSUI & PARTNER; Siebertstrasse 4, 81675 München (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/023023 A1

(54) Title: PRODUCTION AND USE OF HUMAN CD124 AND CD116 POSITIVE TUMOUR CELL LINES IN THE PRODUCTION OF ALLOGENIC OR SEMI-ALLOGENIC IMMUNOTHERAPY AGENTS

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG UND VERWENDUNG VON HUMANEN CD124 UND CD116 POSITIVEN TUMOR-ZELLINIEN ZUR HERSTELLUNG VON ALLOGENEN ODER SEMI-ALLOGENEN IMMUNTHERAPEUTIKA

(57) Abstract: Disclosed is a method for the production and use of CD124+ and CD116+ cell lines in the production of effective dendritic cells (DC) with the aid of stimulatory molecules.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Herstellung und Verwendung von CD124+ und CD116+ Zelllinien zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen (DC) mit Hilfe von stimulatorischen Molekülen vorgeschlagen.

WO 03/023023

1

PCT/EP02/09260

5

**Herstellung und Verwendung von humanen CD124 und CD116
positiven Tumorzelllinien zur Herstellung von alloge-
nen oder semi-alloge-
nen Immuntherapeutika**

10

Beschreibung

15

20

25

Die Erfindung beschreibt die Herstellung und Verwendung von CD124+ und CD116+ Zelllinien zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen (DC) mit Hilfe von stimulatorischen Molekülen, ihre Verwendung zur Herstellung von alloge-
nen oder semi-alloge-
nen Immuntherapeutika, und deren Verwendung zur Behandlung oder Prophylaxe von Immunerkrankungen. Außerdem beschreibt die Erfindung die Verwendung von CD124+ und CD116+ Tumorzelllinien, die bevorzugt auch CD34+ sind, als Modell- und Testsystem für die Testung der DC-Biologie und für die Testung von Substanzen, die auf das Immunsystem und dessen Konditionierung Einfluß nehmen.

30

35

Dendritische Zellen (DC) spielen eine wichtige Rolle als Antigen-präsentierende Zellen (APC). Sie übermitteln costimulatorische Signale, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind, und induzieren primäre Immunantworten durch die Präsentation von Antigenen für CD4⁺- und CD8⁺ - T-Zellen (Banchereau et al. 1998, Nature 392 (6673): 245-252). DC entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und durchlaufen sequentiell verschiedene Differenzierungsstufen (intermediäre Vorläuferzellen im Blut und unreife DC in den peripheren Geweben und Organen) (Banchereau et al. 2000, Ann Rev

5 Immunol 18: 767-811). Einmal im Gewebe angelangt erfüllen unreife DC (iDC) eine wichtige Sensorfunktion, die durch eine hohe aktive Aufnahme von Antigenen aus dem umgebenden Milieu gekennzeichnet ist. Nach ihrer Stimulation durch externe Signale („Danger Signals“) wie z.B. bakterielle
10 oder virale Infektionen oder Entzündungen migrieren die DC in die peripheren lymphatischen Organe, wo sie zu reifen DC ausdifferenzieren und mittels Antigen-Präsentation T-Zellen aktivieren.

15 Nach bisherigen Methoden zur Herstellung von DC in vitro erhält man zwei Hauptpopulationen von DC- Vorläuferzellen: CD1a⁺/CD14⁻ -Zellen, die sich zu Langerhans-Zellen (LC) entwickeln, und CD1a⁻/CD14⁺ -Zellen, die zu interstitiellen DC ausdifferenzieren. Monozyten können nach der
20 Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 einen Phänotyp entwickeln, der dem unreifen DC (iDC) ähnelt. Eine weitere Differenzierung und Reifung wird durch verschiedene Stimuli, wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), TNFalpha, PGE2, CD40-Ligand oder PolyIC erreicht. Die
25 bisher verfügbaren, definierten Kultursysteme wurden für Untersuchungen zur Biologie der DC eingesetzt. Ihr Einsatz für Experimente im großen Maßstab ist aber limitiert durch die Abhängigkeit von verfügbarem Spendermaterial und dessen Variabilität. Im Maussystem haben sich Zytokin (GM-CSF)-
30 abhängige dendritische Zelllinien als sehr wertvoll für das Studium der DC-Differenzierung und -Entwicklung in in vitro und in vivo Krankheitsmodellen erwiesen. Solche Zelllinien wurden durch Immortalisierung von murinem Lymph- oder Hautgewebe gewonnen. Sie repräsentieren einen unreifen DC-
35 Phänotyp, der invariabel ist und erlauben daher nicht die Untersuchung verschiedener Faktoren, die an der Differenzierung von DC beteiligt sind. Außerdem lassen sich

WO 03/023023

3

PCT/EP02/09260

5 aufgrund der Heterogenität von DC im murinen und humanen
System wenn überhaupt, dann nur sehr begrenzt Aussagen zur
humanen DC-Biologie treffen.

Es konnte beobachtet werden, daß Tumoren lymphoiden oder
10 myeloiden Ursprungs Gemeinsamkeiten mit APC in der
Ontogenese aufweisen. Studien mit PBMC von Patienten mit
chronisch myeloischer Leukämie (CML) und akkuter
myeloischer Leukämie (AML) haben gezeigt, daß in
Subpopulationen von CML und AML-Blasten durch Zytokine eine
15 in Teilen DC-ähnliche Differenzierung erzielt werden kann,
die zum Teil eine verstärkte APC-Funktion aufweisen.
Daraufhin wurde versucht etablierte leukämische Zelllinien
als in vitro Modellsysteme für Untersuchungen zur DC
Biologie zu verwenden. Dies gelang allerdings nicht, da
20 alle untersuchten Zelllinien nur bestimmte Stadien der DC
Entwicklung erreichen konnten, über die hinaus sie nicht
weiter differenzieren konnten, und damit die DC Biologie
nicht wie gewünscht widerspiegeln. Dies ist darauf zurück
zu führen, dass die Fähigkeit solcher maligner Zellen, auf
25 Zytokinstimuli zu antworten, von der Expression
spezifischer und funktioneller Rezeptoren abhängig ist.
Viele Leukämie-Zelllinien reagieren jedoch nicht auf eine
Zytokin-Behandlung. Andere bisher untersuchte Leukämie-
Zelllinien reagieren nur auf die Behandlung mit einzelnen
30 Zytokinen und können nicht durch eine sequentielle DC
Differenzierung zu effektiven DC gebracht werden.
Pharmakologische Agenzien, die intrazelluläres Kalzium
mobilisieren und damit defekte Rezeptor-Signalwege umgehen,
können zwar verwendet werden, um einen DC-ähnlichen
35 Phänotyp in myeloiden Zellen zu induzieren, und die
Aktivierung von Proteinkinase C durch PMA induziert einen
DC-Phänotyp in der humanen Myeloblasten-Zelllinie KG-1,

5 allerdings führt die Manipulation intrazellulärer
Signalwege mit solchen Agenzien zu APC, die nicht die volle
DC-Funktion ausfüllen können. Im Fall der Zytokin-
stimulierten KG-1 wurde so z.B. keine Differenzierung ohne
sofortige Reifung beobachtet werden.

10 Damit sind die bisher untersuchten Zelllinien für
Untersuchungen der DC Biologie nur sehr begrenzt geeignet.
Für Immuntherapeutikaawendungen und Testsysteme für die
Testung von Substanzen, die auf das Immunsystem Einfluß
15 nehmen sind diese nicht geeignet. Der Stand der Technik war
daher, dass leukämische Zelllinien oder andere
Tumorzelllinien nicht in der Lage sein sollten durch
entsprechende Stimulation zu unreifen DC, die entsprechend
der Stimulation entweder interstitielle DC oder Langerhans
20 DC ähnlich sind, und darauffolgend zu potenten reifen DC,
gezielt entweder DC Typ1 oder DC Typ2, zu differenzieren.

25 Zur Zeit werden DC in unterschiedlichen Verfahren und
Ansätzen für die Behandlung verschiedener Erkrankungen
eingesetzt, darunter beispielsweise Tumorerkrankungen,
Infektionserkrankungen und Autoimmunerkrankungen. Die
Ergebnisse hierfür sind erfolgreich und vielversprechend.
Allerdings müssen zur Zeit für alle Behandlungen DC
30 eingesetzt werden, die aus Primärzellen gewonnen werden, da
es bisher trotz großer Bemühungen nicht gelungen ist
Zelllinien zu generieren und zu identifizieren, aus denen
DC erzeugt werden können, die eine effektive Immunantwort
stimulieren. Die Nachteile von DC aus Primärzellen sind
35 beispielsweise, dass sie, beziehungsweise ihre
Vorläuferzellen, nur in sehr geringen Mengen von Patienten
oder Spendern gewonnen werden können, die den Einsatz der

5 Zellen stark limitieren, ihre Gewinnung ist von zeitlich
und arbeitstechnisch großem Aufwand, die Menge der
gewonnenen DC ist so gering, dass bei weitem nicht die
Mengen proportional im Menschen eingesetzt werden können,
die in Maus-Modellen die besten Behandlungserfolge erzielen
10 können. Die DC müssen dabei aus Vorläufer-Zellen, wie
beispielsweise CD34 positiven Stammzellen oder Monozyten,
gewonnen werden, die in vitro durch eine geeignete
Stimulierung mit stimulatorischen Molekülen zu DC reifen,
wobei die Vorläufer-Zellen sowohl im Blut wie auch im
15 Gewebe äußerst selten vorkommen. Es wird geschätzt, dass
sie etwa 1% der PBMC darstellen. Außerdem ist ihre Kultur
schwierig und wird durch die aus den PBMC gewonnene Menge
an Monozyten stark limitierend beeinflusst und häufig durch
Verunreinigungen an Progenitor Zellen gestört. Die
20 resultierende große Varianz in der Reinigungs-,
Stimulierungs und Effektivitätseffizienz von autologen DC-
Vorläuferzellen erschweren eine Standardisierung von
Verfahren für Immuntherapeutische Behandlungen sehr. Zu der
Varianz innerhalb eines Patienten kommt noch die Varianz
25 zwischen den einzelnen Individuen hinzu.

Für die Entwicklung von Immuntherapeutika auf der Basis von
effektiven DC ist es vorteilhaft genau charakterisierte
Zelllinien zu generieren, die entweder effektive DC
30 darstellen oder durch geeignete Stimulierung mit geeigneten
Signalmolekülen in vitro sich zu solchen wandeln lassen,
die dann alleine oder in Kombination mit anderen Stoffen
effektive Immuntherapeutika ergeben.

35 Die erfindungsgemäße Aufgabe ist es daher, ein Verfahren
zur Herstellung von Zelllinien oder Zellen bereitzustellen,
aus denen sich effektive dendritische Zellen(DC) generieren

WO 03/023023

6

PCT/EP02/09260

5 lassen, die insbesondere als Immuntherapeutika oder als Teil von Immuntherapeutika zur Behandlung von Immunerkrankungen eingesetzt werden können.

10 Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien, wobei Zellen von CD124 und CD116 positiven Zelllinien mit mindestens einem stimulatorischen Molekül zeitgleich oder
15 sequentiell zeitversetzt in Kontakt gebracht und die effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien erhalten werden.

Im Zusammenhang mit der Erfindung sollen folgende Begriffe wie folgt verwendet werden:

20 Unter **Zelllinien** aus denen effektive dendritische Zellen (effektive DC) erfindungsgemäß gewonnen werden fallen alle Tumorzelllinien, bevorzugt leukämische Zelllinien, wie beispielsweise myeloide, lymphoide und plasmacytoide, und
25 solche Zelllinien, die nicht leukämischen Ursprungs sind, aber CD124 und CD116, bevorzugt auch CD34, tragen, einschließlich solcher Zelllinien die nicht Tumorzelllinien im strengen Sinne sind. Dabei kann es sich auch um Zelllinien handeln, denen CD124 und/oder CD116 fehlt, die
30 aber durch ein Einbringen von Genen funktionelle rekombinante CD124 und CD116 exprimieren die es ermöglichen effektive DC herzustellen. Vorzugsweise sind Zelllinien, aus denen effektive DC gewonnen werden auch positiv für CD34, wobei CD34 auch durch Gene eingebracht werden kann.
35 Solche Zelllinien, aus denen effektive DC hergestellt werden können aus Tumorzellen oder Primärzellen gewonnen werden. Dies geschieht durch an sich herkömmliche

5 Verfahren, wie beispielsweise Transformation,
Immortalisierung, Zellfusion mit Tumorzellen und/oder durch
Kultivierung in vitro und/oder in vivo mit oder ohne
Klonierung der Zellen möglichst homogenen Zelllinien.
Bevorzugt werden dabei Verfahren bei denen die CD124 und
10 CD116 positiven Zellen durch Magnetkugel Techniken oder
Cell-Sorting im FACS nach an sich bekannten Methoden
angereichert und kloniert werden. Als Spender für
Tumorzellen, die erfindungsgemäß durch stimulatorische
Moleküle zu Zelllinien gebracht werden, aus denen effektive
15 DC gewonnen werden, werden Patienten mit chronischer
myeloischer Leukämie oder akuter myeloischer Leukämie
bevorzugt, die Erfindung beschränkt sich jedoch nicht
darauf. Primärzellen aus denen geeignete Zelllinien
gewonnen werden sind bevorzugt myeloiden, lymphoiden,
20 plasmacytoiden oder monocytären Ursprungs. Um effektive DC
aus Zelllinien zu gewinnen und /oder die Effektivität der
gewonnenen DC zu steigern, können in die Zelllinien,
Tumorzellen oder Primärzellen ein oder mehrere Gene nach an
sich bekannten Methoden eingebracht, die beispielsweise
25 Rezeptoren oder Inhibitoren für stimulatorische Moleküle
codieren und/oder exprimieren. Als Gene können auch ein
oder mehrere Immuntherapeutika eingebracht werden. Das
Einbringen der Immuntherapeutikagene in diesem Stadium der
Zelllinie hat den Vorteil, dass sie als Zelllinie
30 charakterisiert werden können und für eine weitere
Verwendung als Immuntherapeutika nicht nach der Reifung zu
dendritischen Zellen eingebracht werden müssen. Eine weitere
Möglichkeit der Einbringung von Genen ist die Fusion der
Zelllinien mit anderen Zellen oder Zelllinien nach an sich
35 bekannten Methoden:

5 Unter **effektiven DC** versteht man erfindungsgemäß solche Zellen oder Zelllinien, die durch Stimulation von Zelllinien mit stimulatorischen Molekülen zu Zellen differenzieren, die wie dendritische Zellen agieren und humorale und/oder zelluläre Teile des Immunsystems
10 aktivieren, inhibieren oder modulieren. Die effektiven DC werden als Immuntherapeutika eingesetzt. Hierfür werden die effektiven DC, ihre Vorläuferzellen in den geeigneten Differenzierungsstadien oder die Zellen der Zelllinien mit mindestens einem Antigen beladen. Die Beladung erfolgt nach
15 an sich bekannten Methoden beispielsweise durch Beladung mit synthetischen oder aus biologischem Material gereinigten oder partiell gereinigten Tumorantigenen oder Infektionsantigenen, mit Zelllysaten von Tumorzellen, Tumorzelllinien, infizierten Zellen oder Zelllinien, durch
20 Fusion mit anderen Zellen oder Zelllinien, durch Einbringung von mindestens einem Immuntherapiegen, durch Infektion mit infektiösen Partikeln oder jeweils teilen daraus. Gegebenenfalls werden die beladenen Zellen oder Zelllinien weiter durch stimulatorische Moleküle
25 differenziert. Die effektiven DC prozessieren in der Regel die Antigene und präsentieren sie über bestimmte Moleküle den entsprechenden Immunzellen des Immunsystems, beispielsweise über MHC I oder MHC II Moleküle, und aktivieren dadurch entsprechend die humorale und/ oder zelluläre
30 Immunantwort, die die Krankheit bekämpft oder ein immunologisches Memory aufbaut, das prophylaktisch Krankheiten verhindert. Die effektiven DC werden hierfür in mindestens einem geeigneten Aktivitäts- und/oder Effektorstadium im Patienten als Immuntherapeutikum
35 eingesetzt.

WO 03/023023

9

PCT/EP02/09260

5 Unter **stimulatorischen Molekülen** versteht erfindungsgemäß
solche chemischen und biologischen Moleküle, die eine
Differenzierung von Zellen beeinflussen wie beispielsweise,
Cytokine (IL-4, TNFalpha), Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF),
surrogat Moleküle für Cytokine oder Wachstumsfaktoren,, die
10 einen vergleichbaren biologischen Effekt induzieren wie die
stimulatorischen Moleküle selbst, beispielsweise
Antikörper, andere biologische Moleküle (z.B. LPS, polyIC)
und chemische Agenzien. Die Moleküle können zeitgleich
gemeinsam oder sequentiell zeitversetzt angewandt werden
15 um das entsprechende gewünschte Differenzierungsstadium der
Zellen und damit unterschiedliche Aktivitäts- und
Effektorstadien zu erreichen, beispielsweise DC Typ1 oder
DC Typ 2 Phänotypische Zellen, die je nach Eignung für die
verschiedenen Verwendungen eingesetzt werden können.
20 Beispielsweise können so durch verschiedene stimulatorische
Moleküle aus der gleichen Tumorzellausgangslinie
unterschiedlich effektive DC hergestellt werden, die
beispielsweise inhibitorisch oder stimulatorische auf
verschiedene Komponenten des Immunsystems wirken und damit
25 beispielsweise entweder in der Immuntherapie von
Infektionserkrankungen und Tumorerkrankungen oder
Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden. Unter
stimulatorische Moleküle fallen erfindungsgemäß außerdem
alle Danger Signale einschließlich solcher, die streng
30 genommen keine Moleküle sind, wie beispielsweise
mechanischer Streß.

Unter **Immuntherapeutika** versteht man im Sinne der
Erfindung:
35 - solche Therapeutika, die gegen Erkrankungen
prophylaktisch oder kurativ eingesetzt werden, bei denen
effektive dendritische Zellen für die Behandlung eingesetzt

5 werden können, wobei die geeigneten effektiven dendritischen Zellen unterschiedlicher Entwicklungs- und Aktivierungsstadien sein können. Die Behandlungserfolg kann dabei vollständig oder partiell sein. Dabei kann es sich beispielsweise um Vakzinen handeln.

10

Semi-allogene DC für Immuntherapeutika sind erfindungsgemäß solche effektiven DC, die in einem oder mehreren der HLA Moleküle mit dem Empfänger der Immuntherapeutika übereinstimmen und die Zellen nicht von der gleichen Person stammen. Damit sind auch solche DC enthalten die eine
15 komplette Übereinstimmung in den HLA Molekülen aufweisen und nicht von der gleichen Person stammen.

20

Allogene DC für Immuntherapeutika sind erfindungsgemäß solche effektiven DC, die in keinem der HLA Moleküle mit dem Empfänger der Immuntherapeutika übereinstimmen.

25

Unter CD124 positiven Zelllinien oder Zellen versteht man erfindungsgemäß solche Zellen, die gegenüber einer Behandlung mit IL-4 sensitiv sind.

30

Unter CD116 positiven Zelllinien oder Zellen versteht man erfindungsgemäß solche Zellen, die gegenüber einer Behandlung mit GM-CSF sensitiv sind.

35

Unter Immunerkrankungen versteht man erfindungsgemäß alle Erkrankungen, bei denen dendritische Zellen zur Behandlung eingesetzt werden können, beispielsweise:

- Infektionskrankheiten
- Tumorerkrankungen
- Autoimmunerkrankungen.

5

Unter dem **Einbringen von Genen** versteht man
erfindungsgemäß, eine Transfektion oder virale Infektion
oder Transformation von Zellen oder Zelllinien wodurch
10 genetisches Material in die Zelle oder Zelllinien nach an
sich bekannten Methoden eingebracht wird. Das genetische
Material kann dabei DNA oder RNA sein. Das genetische
Material codiert für die Expression von mindestens einem
Protein oder Peptid oder/und die RNA selbst kann dabei
15 inhibitorisch oder stimulatorisch, beispielsweise als
Antisense-RNA, wirken. Die exprimierten Proteine können
weiter prozessiert und modifiziert werden, beispielsweise
durch Glykosylierung. Gene können auch dadurch eingebracht
werden, dass die Zellen oder Zelllinien mit anderen Zellen
20 oder Zelllinien fusioniert werden.

Immuntherapeutikogene sind erfindungsgemäß Gene die für
Proteine und/ oder Peptide kodieren, die für die Verwendung
der effektiven dendritischen Zellen als Immuntherapeutika
25 eine Rolle spielen, beispielsweise Tumorantigene, virale
Antigene oder Antigene von Parasiten, Bakterien oder
anderen Mikroorganismen. Zellen oder Zelllinien in die
Immuntherapeutikogene eingebracht wurden exprimieren die
Proteine oder Peptide dieser Gene. Diese werden dann von
30 den dendritischen Zellen dem Immunsystem präsentiert,
wodurch die effektiven dendritischen Zellen entsprechende
Immunantworten abhängig von dem Aktivitäts - und
Effektorstadien der effektiven dendritischen Zellen
aktivieren, inhibieren oder modulieren. Für die
35 Präsentation der Genprodukte werden die exprimierten
Proteine oder Peptide prozessiert oder direkt verwendet,

5 außerdem können die exprimierten Proteine oder Peptide
modifiziert werden, beispielsweise durch Glykosylierung.

Surrogat-Moleküle sind erfindungsgemäß solche Moleküle, die
die stimulatorischen Moleküle wirkungsmäßig ersetzen
10 können, beispielsweise können anstatt von Cytokinen
Antikörper oder Mimikry-Peptide verwendet werden die die
Zellen ebenfalls wie stimulatorische Moleküle beeinflussen.

Um Zellen erfindungsgemäß in die **Apoptose oder Nekrose** zu
15 bringen, werden je nach Bedarf unterschiedliche Verfahren
angewendet, beispielsweise Bestrahlung, Hitzeschock,
mechanischer Streß, oxidativer Streß, Ultraschall,
Induktion von Suizidgenen, Induktion durch chemische und
biologische Moleküle, Glyzerin, Zink, Butilinsäure,
20 Natriumbutyrat, Leptomycin B mit STI571 und/oder Fas-
Ligandgebracht werden. Dabei können die Zellen auch
Mischpopulationen bilden, von denen Teile in die Apoptose
oder Nekrose gehen. Dieses Verfahren kann angewendet
werden um sicherzustellen, daß effektive dendritische
25 Zellen im Organismus nicht lebensfähig sind.

Tumorantigene sind erfindungsgemäß Peptide, Proteine,
Lipide, Lipopeptide, Lipoproteine, Kohlenhydrate,
Glykolipide, Glykopeptide, Glykoproteine, phosphorylierte
30 Proteine, phosphorylierte Peptide, anderweitig
posttranslational modifizierte Proteine oder Peptide, die
in den Zellen des Tumors vergleichend zum Normalgewebe,
überexprimiert werden, unterexprimiert werden, de novo
exprimiert werden, mutiert sind, differentiell
35 posttranslational modifiziert sind, differenziell
prozessiert werden, differenziell lokalisiert werden,

5 differenziell gefaltet werden, oder andersweitig verändert sind.

Infektionsantigene sind erfindungsgemäß Peptide, Proteine, Lipide, Lipopeptide, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Glykolipide, Glykopeptide, Glykoproteine, phosphorylierte Proteine, phosphorylierte Peptide, anderweitig posttranslational modifizierte Proteine oder Peptide, die vom infektiösen Partikel stammen oder davon abgeleitet sind.

15 **Infektiöse Partikel** sind erfindungsgemäß infektiöse Einheiten, die Krankheiten verursachen oder davon abgeleiteten Teilen. Hierzu gehören beispielsweise Viren, Bakterien, Parasiten und Prionen. Die infektiösen Partikel, die erfindungsgemäß zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen und ihrer Verwendung dienen sind in vivo im Patienten nicht vermehrungsfähig.

25 Außerdem beschreibt die Erfindung die Verwendung und Herstellung von CD124+ und CD116+ Tumorzelllinien, die bevorzugt auch CD34+ sind, als Modell- und Testsysteme für die Testung der DC-Biologie und für die Testung von Substanzen, die auf das Immunsystem und dessen Konditionierung Einfluß nehmen.

35 Unter einem **Modell- und Testsystem für die Testung der DC-Biologie** versteht man erfindungsgemäß Testsysteme die als Komponente eine CD124+ und CD116+ Tumorzelllinie haben, die bevorzugterweise auch CD34+ ist, und mit deren Hilfe Vorgänge während der Differenzierung der dendritischen Zellen und von Zellen die zu dendritischen Zellen reifen

5 aufgeklärt werden und/ oder mit deren Hilfe Vorgänge
aufgeklärt werden, die bei der Aktivierung, Inhibierung
oder Modulation des Immunsystems und seiner Immunantwort
durch die DC oder ihre Vorläuferzellen beeinflusst werden.
Zu der Aufklärung dieser Vorgänge gehören auch die
10 Aufklärung von anderen Einflüssen wie beispielsweise der
Einfluß von stimulatorischen Molekülen und/oder ihre
zeitliche Wirkung beispielsweise während der Differenzierung
der DC und Aktivitätsmodulierung des Immunsystems. Diese
Modell- und Testsysteme können beispielsweise in Form von
15 Kits und/oder High-Throughputsystemen verwendet werden. Die
einzelnen Testarten und ihre Durchführung sind dem Fachmann
bekannt.

Unter einem Modell- und Testsystem für die Testung von
20 Substanzen die auf das Immunsystem wirken versteht man
erfindungsgemäß Testsysteme die als Komponente eine CD124+
und CD116+ Tumorzelllinie haben, die bevorzugterweise auch
CD34+ ist, und mit deren Hilfe getestet werden kann ob
Substanzen einen Einfluß auf das Immunsystem und/oder
25 dessen Konditionierung haben. Darunter fallen unter anderem
auch Testsysteme, die der Entwicklung von Immuntherapeutika
dienen, beispielsweise die Testung geeigneter Tumorzelllinien
und ihrer Formulierungen und solche Testsysteme, die es
erlauben den Einfluß von Substanzen, die keine
30 Immuntherapeutika sind, wie beispielsweise chemische
Stoffe, Pharmakologische Agenzien, Kosmetika oder ihre
Vorstufen, oder Nahrungsmittel oder ihre Komponenten, auf
das Immunsystem zu testen. Solche Testsysteme können damit
zur Produktentwicklung von beispielsweise Immuntherapeutika
35 und anderen Produkten dienen, die einen Einfluß auf das
Immunsystem ausüben können. Diese Modell- und Testsysteme
können beispielsweise in Form von Kits und/oder High-

5 Throughputsystemen verwendet werden. Die einzelnen Testarten und ihre Durchführung sind dem Fachmann bekannt.

10 Zellen, die positiv für CD124 sind tragen den Rezeptor für IL4, die CD116+ den Rezeptor für GM-CSF, und die CD34+, den Marker für haematopoietische Stamm- und Progenitor-Zellen

15 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Peptiden, die von den erfindungsgemäßen effektiven Dendritischen Zellen präsentiert werden, umfassend die Schritte

- (a) Vermehren der erfindungsgemäßen Dendritischen Zellen nach an sich bekannten Methoden, wobei die Dendritischen Zellen unreif sind;
- 20 (b) Zugeben von Antigenen oder Immunogenen oder Teilen davon oder Zelllysaten, wobei die unreifen Dendritischen Zellen (iDC) zu reifen Dendritischen Zellen (mDC) reifen, und die Antigene oder Immunogene oder Teile davon oder die Zelllysate
- 25 prozessieren und geeignete Peptide im Kontext von MHC Klasse I oder MHC Klasse II Molekülen präsentieren;
- (c) Gewinnen der präsentierten Peptide von den Dendritischen Zellen nach an sich bekannten Verfahren; und
- 30 (d) Identifizieren/Bestimmen der abgelösten Peptide nach an sich bekannten Methoden.

35 Bevorzugt werden die gewonnenen Peptide durch an sich bekannten Methoden aufgetrennt, wie z.B. mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Besonders bevorzugt werden die aufgetrennten Peptide

5 massenspektrometrisch identifiziert und am meisten
bevorzugt werden die Peptide sequenziert.

Bevorzugt, erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die
Validierung der identifizierten/bestimmten Peptide. Mehr
10 bevorzugt wird, dass identifizierte/bestimmte Peptide, die
nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnen werden,
synthetisch nach an sich bekannten Methoden hergestellt
werden. Am meisten bevorzugt wird, dass die synthetisch
hergestellten Peptide zu unreifen und/oder reifen
15 erfindungsgemäßen Dendritischen Zellen zugegeben werden,
wobei die Dendritischen Zellen nach an sich bekannten
Methoden beladen („gepulst“) werden. In einer Variante wird
anstatt des Schrittes (b) folgender Schritt durchgeführt:
Beladen von zu mDC gereiften Zellen mit MHC I und/oder MHC
20 II Peptiden. Diesem Schritt kann ein Schritt nach an sich
bekannten Methoden zur Entfernung bestehender MHC I
und/oder MHC II Peptide vorgeschaltet sein. Bevorzugt
handelt es sich dabei um Bibliotheken von MHC I und/oder
MHC II Peptiden, die den mDC angeboten werden.

25 Mit der Erfindung konnten überraschenderweise leukämische
Zelllinien mit einer bestimmten Eigenschaft gefunden
werden, die sich in allen Aspekten wie ein immortalisiertes
Equivalent von CD34+ DC Precursor Zellen verhält und für
Untersuchungen der DC Biologie, der Testung von Substanzen
30 die das Immunsystem beeinflussen und für Immuntherapeutika
geeignet sind. Die bestimmten Eigenschaften der
Tumorzelllinien ist eine Positivität für CD124 (IL-4R) und
CD116 (GM-CSFRalpha) und bevorzugt CD34. Als Beispiel wird
die myeloide Zelllinie MUTZ-3 näher beschrieben, von der
35 kürzlich bekannt wurde, dass sie auf Stimulation mit IL-4
und GM-CSF die Expression von CD14 herunterreguliert. Die
Untersuchungen der Erfindung zeigen, daß die im Vergleich

5 mit anderen bekannten und getesteten leukämischen Zelllinien und anderen Tumorzelllinien MUTZ-3-Zellen einzigartig sind in ihrer Fähigkeit, einen unreifen DC-Status zu erlangen. Zudem exprimieren sie nach weiterer Stimulierung den Reifungsmarker CD83, und funktionelle
10 Assays beweisen ihre Fähigkeit zur Antigen-Prozessierung und -Präsentation. Damit ist sie für Immuntherapeutikazwecke geeignet. MUTZ-3 ist die erste humane Leukämiezelllinie, die zur Differenzierung und zur Ausprägung eines unreifen DC-Phänotyps angeregt werden kann und ist als in vitro
15 Modell für Untersuchungen der molekularen und physiologischen Wege, die zur Differenzierung und Reifung DC führen und zur Untersuchung der DC-Biologie und zur Testung von Substanzen, auf einen Einfluß auf das Immunsystem geeignet.

20 Im Rahmen der Erfindung wird überraschend gezeigt, dass es möglich ist, aus humanen Tumorzelllinien effektive DC zu generieren, die insbesondere als Immuntherapeutika oder als Teil von Immuntherapeutika zur Behandlung von
25 Immunerkrankungen eingesetzt werden können. Kerneigenschaften der Zelllinien ist ihre CD124 und CD116 Positivität, die beispielsweise aus leukämischen Zellen gewonnen werden können, und die Sensitivität gegenüber stimulatorischen Molekülen, wie beispielsweise Zytokinen, während andere untersuchte leukämische Zelllinien, die
30 diese Eigenschaften nicht zeigen, keine effektiven DC im Sinne der Erfindung ergeben. Bevorzugt wird eine Zelllinie, die es ermöglicht, dass aus der Zelllinie durch eine sequentielle Stimulation mit stimulatorischen Molekülen DCs
35 unterschiedlicher Aktivierungs- und Effektorstadien gewonnen werden. Die einzelnen Aktivierungs- und Effektorstadien können als effektive DC für die

5 Aktivierungene unterschiedlicher Teile des Immunsystems
dienen, und dabei entweder über MHCI Präsentation CD8+ T
Zellen aktivieren, über MHCII Präsentation CD4+ T Zellen
aktivieren, oder über CD1 NKT Zellen aktivieren. Aktivierte
DC werden dabei hauptsächlich für Immuntherapeutika
10 eingesetzt, die für die Behandlung von
Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen verwendet
werden. Weiterhin können geeignete DC Aktivierungsstadien
zur Induktion von Anergien und Toleranzen führen, und
eignen sich dazu zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

15

Im weiteren ist die Erfindung am Beispiel der humanen
myeloiden Zelllinie MUTZ-3 näher beschrieben.
Die humane akute myeloide leukämische Zelllinie MUTZ-3 ist
sensitiv gegenüber solchen Zytokinen, die dafür
verantwortlich sind, dass in in vivo und in in vitro
20 Modellen aus Monozyten und CD34 positiven Stammzellen DC
generiert werden. MUTZ-3 Zellen verhalten sich in allen
Eigenschaften wie immortalisierte Äquivalente von CD34
positiven DC-Vorläufer Zellen. Durch Stimulation mit den
jeweils geeigneten spezifischen Zytokin-Cocktails
25 entwickeln sie sich zu Zellen mit Phenotypen, die den
Phenotypen von z.B. interstitiellen DC oder Langerhans
Zellen entsprechen. Durch eine Reifung (Maturation)
exprimieren die Zellen CD83. MUTZ-3 besitzt das komplette
Spektrum von Antigenprozessierungs- und Präsentierungs-
30 prozessen für MHC-abhängige und CD1d-abhängige
Präsentation und Aktivierung. Unter geeigneten Bedingungen
, z.B. Gabe von Interferon-gamma oder Dexamethason, können
sie gezielt einen DC1 Phänotyp oder DC2 Phänotyp annehmen
wodurch eine Immunantwort gesteuert werden kann. Dies
35 zeigt, dass MUTZ-3 Zellen eine unlimitierte Quelle für CD34
positive DC Vorläuferzellen (Progenitors) darstellen, die

5 effektiv in der (gezielten) Stimulierung der verschiedenen Immunzellen und somit als effektive DC für die Behandlung von Immunerkrankheiten eingesetzt werden können.

10 Die im Sinne der Erfindung wichtige Komponente für Immuntherapeutika ist die Zelllinie die selbst effektive DC darstellt oder aus der durch eine Behandlung mit geeigneten stimulatorischen Molekülen effektive DC entstehen. Im Sinne der Erfindung können die effektiven DC mit weiteren Komponenten zu allopathen oder semi-allopathen
15 Immuntherapeutika kombiniert werden, wobei es auch bei Bedarf zu einer weiteren Reifung der Zellen gegebenenfalls durch geeignete stimulatorische Moleküle kommen kann. Im Beispiel 1 ist dies für MUTZ-3 jeweils für MHC I, MHC II und CD1 vermittelte Aktivierung beschrieben. Darauf ist die
20 Erfindung jedoch nicht beschränkt sondern umfasst alle therapeutischen oder prophylaktischen Anwendungsgebiete, bei der DC Zellen eingesetzt werden können.

25 Hierunter fallen beispielsweise Tumorthherapeutika. Diese können beispielsweise hergestellt werden, indem die allopathen der semi-allopathen effektiven DC beispielsweise mit Tumorantigenen nach an sich bekannten Methoden gepulst und dem Patienten verabreicht werden. Tumorantigene können dabei einzelne oder mehrere definierte Moleküle wie
30 beispielsweise Peptide, Glykopeptide, Proteine, Glykoproteine, Glykolipide sein, die synthetisiert, gereinigt oder in Form von Zelllysaten verwendet werden; ein weiteres Beispiel ist die Transfektion der effektiven DC mit RNA, DNA oder viralen Vektoren, die Tumorantigene
35 oder Teile davon kodieren; ein weiteres Beispiel ist die Antigenbeladung von effektiven DC durch Inkubation mit apoptotischen und/oder nekrotischen Tumorzellen, oder mit

5 hitzeschockbehandelte Zellen; ein weiteres Beispiel ist die
Fusion mit Tumorzellen. Eine klinische Anwendung solche im
Rahmen der Erfindung hergestellte DC erfolgt in Form
allogener oder semi-allogener DC prophylaktisch oder als
kurative Therapie, z.B. um Tumoren zu therapieren oder nach
10 Entfernung solcher Tumoren, z.B. durch Chirurgie, als
Adjuvanttherapie zur Behandlung der minimalen residualen
Erkrankung einschließlich Metastasen zu bekämpfen oder um
die Bildung von Metastasen bzw. Mikrometastasen zu
verhindern.

15 Eine Reihe von Immunisierungs-Strategien sind möglich, u.a.
die intranodale, intratumorale, intradermale,
intramuskuläre, subkutane, intraperitoneale or mukosale
Applikation von DC mit oder ohne zusätzliche
20 Immunostimulanzen wie, z.B. Zytokine, Chemokine oder
andere immunostimulatorische bzw. immunomodulatorische
Substanzen. Dabei können die erfindungsgemäß hergestellten
DC auch Teil komplexerer Immunisierungsschemata sein bei
der beispielsweise weitere Komponenten zeitgleich oder
25 zeitversetzt gegeben werden.

Obwohl sich die aus MUTZ-3 abgeleiteten DC nach
Differenzierung nicht mehr teilen, kann es nicht
ausgeschlossen werden, daß DC die aus anderen Leukämie
30 Zellen oder Linien hergestellt werden sich weiterhin
teilen. Daher ist eine bevorzugte Variante die Bestrahlung
solcher Antigen-beladenen DC, ihre Behandlung mit Mitomycin
C, oder eine andere Maßnahme, die eine Teilung der Zellen
in vivo verhindert. Eine Alternative wäre beispielsweise
35 die Inkorporation eines sogenannten Suizid-Genes, wie z.B.
das HSV Thymidine Kinase (TK) Gens, das es erlaubt solche

5 HSV TK-tragende Zellen durch Gancyclovir selektiv abzutöten.

10 Die Erfindung betrifft auch die Herstellung von Zelllinien, die zu effektiven DC gereift werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet die Isolierung von CD34+, CD124+ und CD116+ Zellen nach an sich bekannten Verfahren aus humanem Material bevorzugt Leukämiepatienten.
15 Die Zellen können beispielsweise aus dem peripheren Blut oder Knochenmark von Leukämiepatienten durch Anreicherung von Zellen, die CD34+, CD124+ und CD116+ sind, mit Hilfe von Magnetbeads, die Antikörpertragen, die CD34+, CD124+ und CD116+, sequentiell gewonnen werden. Alternativ können
20 CD34+, CD124+ und CD116+ Zellen durch Zellsorting mittels Durchflußzytometrie und CD34-, CD124- und CD116-spezifischen Antikörpern gewonnen werden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels umfassend die
25 Schritte der erfindungsgemäßen Verfahren und weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung des Arzneimittels in pharmazeutisch verträglicher Form, wobei das Arzneimittel gegebenenfalls zusätzlich mit einem Adjuvans als Wirkstoffverstärker kombiniert wird

30 Unter dem Begriff „Arzneimittel“ sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen definiert, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte
35 Beschwerden zu heilen, zu lindern oder zu verhüten. Während des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens können den mit den erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten

- 5 Verbindungen medizinische und/oderpharmazeutisch-technische
Hilfsstoffe zugesetzt werden. Medizinische Hilfsstoffe sind
erfindungsgemäß solche Stoffe, die zur Produktion (als
aktive Ingredienzien) von Arzneimitteln in einem
erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.
- 10 Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen lediglich der
geeigneten Formulierung des Arzneimittels und können sogar,
sofern sie nur während des Verfahrens benötigt werden,
anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch
verträgliche Träger Teil des Arzneimittels sein. Beispiele
15 für pharmazeutisch verträgliche Träger sind nachstehend
aufgeführt.
- Die Arzneimittelformulierung erfolgt gegebenenfalls in
Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger
und/oder Verdünnungsmittel.
- 20 Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger
sind dem Fachmann bekannt und umfassen Phosphat-gepufferte
Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen wie z.B. Öl/Wasser-
Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile
Lösungen, etc.
- 25 Arzneimittel, die solche Träger umfassen, können mittels
bekannter konventionelle Methoden formuliert werden.
Bevorzugt werden Applikationsrouten, bei denen die
erfinderischen effektiven dendritischen Zellen in einer
pharmakologischen Formulierung an Stellen im Körper
30 gebracht werden, wo sie ihre Aufgabe am besten erfüllen
können. Solche Stellen und Applikationsformen sind dem
Fachmann bekannt, beispielsweise intravenös,
intraperitoneal, subkutan, intramuskulär, lokal oder
intradermal, bevorzugt dabei sind beispielsweise intra
35 nodal, intra dermal, subcutan, intrarektal, intravenös oder
lokal. Eine geeignete Applikationsroute kann abhängig von
der Erkrankung unterschiedlich geeignet sein.

5 Beispielsweise ist zielt eine Applikation von effektiven
dendritischen Zellen für die Therapie von
Autoimmunerkrankungen auf eine Toleranz des Immunsystems,
während eine geeignete Applikationsroute für die Behandlung
oder Prophylaxe von Tumor- oder Infektionserkrankungen eine
10 Aktivierung des Immunsystems unterstützen soll. Eine
geeignete Administrationsroute kann vom Fachmann mit
bekannten Methoden bestimmt werden. Die Arzneimittel können
einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht
werden, eine Dosis umfasst 100 bis 10^{12} effektive
15 dendritische Zellen, bevorzugt 10^5 bis 10^{10} . Die effektiven
dendritischen Zellen wurden dabei mit einer geeigneten Form
und Menge an Antigenen beladen worden, die ebenfalls je
nach Einsatz verändert sein kann. Eine Dosis wird bevorzugt
einmal die Woche, bis hinzu größeren Abständen verabreicht
20 wie beispielsweise einem Monat, 3 Monaten, einem Jahr oder
noch längere Abstände. Kürzere Intervalle können ebenfalls
geeignet sein, wie beispielsweise täglich. Dabei kann der
Fachmann den geeigneten zeitlichen Abstand und Dosis
bestimmen. Hierfür kann er bevorzugt Methoden zum
25 Immunomonitoring verwenden und die Dosen entsprechend
anpassen. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt
und werden zum Teil in den Beispielen beschrieben.
Die Art der Dosierung wird vom behandelnden Arzt
entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt. Es ist dem
30 Fachmann bekannt, daß die Art der Dosierung von
verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie z.B. der Größe,
der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder der
allgemeinen Gesundheit des Patienten, aber auch von dem
speziellen Mittel, welches verabreicht wird, der Dauer und
35 Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die
möglicherweise parallel verabreicht werden.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die effektiven
dendritischen Zellen mit einer Reihe von Antigenen beladen.
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Dosen
mit effektiven dendritischen Zellen beladen mit geeigneten
Antigenen mit Dosen kombiniert, die die oder einzelne
10 Antigene oder Teile davon direkt in geeigneten
Formulierungen ohne ex vivo Beladung der dendritischen
Zellen umfassen. Dies hat den Vorteil, dass semi-allogene
ex vivo beladenen erfindungsgemäße dendritische Zellen die
Immunantwort stark induzieren, wobei sie von der
15 Alloresponse als eine Art Danger Signal unterstützt werden
und verbunden sind mit einer teilweise spezifischen
Immunisierung durch die Präsentation überlappender MHC
Moleküle, kombiniert werden mit einer Immunantwort, die die
autologen dendritischen Zellen in vivo ansteuert. Eine
20 solche Kombination ist besonders geeignet um Toleranzen und
Anergien zu brechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden
erfindungsgemäße unreife effektive dendritische Zellen
(iDC-Form), beladen mit entsprechenden Antigen, zur
25 Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Dabei wird
in einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden die
Zellen in der iDC Form transient oder stabil arretiert,
wobei an sich dem Fachmann bekannte Methoden eingestetzt
werden, beispielsweise eine Arretierung durch gentechnische
30 Veränderung. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform
werden die Zellen nach Beladung in der unreifen Form (iDC)
oder reifen Form (mDC) gegebenenfalls weiter gereift und
als beladene effektive dendritische Zellen (mDC) zur
Behandlung oder Prophylaxe von Tumor- oder
35 Infektionserkrankungen eingesetzt.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel umfasst eine
pharmakologische Substanz, die Dendritische Zellen in einer

5 geeigneten Lösung oder Verabreichungsform enthält. Diese
können entweder alleine oder in Kombination mit einem oder
mehreren Adjuvantien oder einem anderen geeigneten Stoff zur
Wirkungsverstärkung verabreicht werden. Als bevorzugte
Adjuvantien werden QS-21, GPI-0100 oder andere Saponine,
10 Wasser-Öl Emulsionen wie beispielsweise Montanide
Adjuvantien, Polylysin, Polyargininverbindungen, DNA-
Verbindungen wie beispielsweise CpG, Detox, Bakterielle
Vakzinen wie beispielsweise Typhusvakzine oder BCG-Vakzinen
verwendet und in einer entsprechend geeigneten Weise nach
15 an sich bekannten Methoden mit den erfindungsgemäßen
Dendritischen Zellen gemischt.
Eine bevorzugte Form der Adjuvantien sind costimulatorische
Faktoren, Cytokine und/oder Wachstumsfaktoren wie
beispielsweise GM-CSF oder IL-2 oder IL-12. Diese können
20 auch in genetischer Form in die Zellen der
erfindungsgemäßen Zelllinien, bevorzugt stabil, eingebracht
werden.
Die erfindungsgemäße Verwendung des Arzneimittels ist zur
Prophylaxe und/oder Behandlung von Krebserkrankungen,
25 Tumoren, Infektionen und/oder Autoimmunkrankheiten. In
einer bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung
oder der Tumor, der/die behandelt oder verhindert wird
ausgewählt aus der Gruppe von Krebserkrankungen oder
Tumorerkrankungen des Kopfes und Genicks, der Lunge, des
30 Mediastinums, Gastrointestinaltrakts, des
Geschlechts/Harnapparatsystems, des gynäkologischen
Systems, der Brust, des endokrinen Systems, der Haut,
Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen der Kindheit,
Primärtumoren, metastatischem Krebs, Weichteil- oder
35 Knochensarkomen, einem Melanom, einem Neoplasma des
zentralen Nervensystems, Lymphomen, Leukämien,
paraneoplastischem Syndrom, peritonealer Carcinomastose

5 und/oder Malignität, die zu immunsupprimierter Malignität
verwandt ist.
Die Infektion, die mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel
behandelt oder verhindert wird, ist ausgewählt aus
bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, pilzlichen
10 Infektionen, Infektionen mit Protozoen und/oder Infektionen
mit Helminthen. Bevorzugt ist die bakterielle, virale,
pilzliche Infektion, Infektion mit Protozoen und/oder
Infektion mit Helminthen, die behandelt oder verhindert
wird, ausgewählt aus Infektionen wie Sepsis oder septischer
15 Schock, Fieber unbekannten Ursprungs, infektiöse
Endokarditis, intraabdominale Infektionen und Abszesse,
akuten Infektionen, Durchfallerkrankungen, bakterielle
Lebensmittelvergiftungen, sexuell übertragbaren
Infektionen, entzündliche Beckeninfektionen,
20 Harnwegsinfektionen, Pyelonephritis, Osteomyelitis,
Infektionen der Haut, Muskeln oder Weichteilen, Infektionen
durch Injektion von Drogen, Infektionen durch Bisse,
Kratzer oder Verbrennungen, Infektionen bei
Transplantatempfängern, Hospitalismus-Infektionen und/oder
25 intravaskuläre Infektionen durch Geräte. In einer mehr
bevorzugten Ausführungsform wird die Infektion, die
verhindert oder behandelt wird, ausgewählt aus bakteriellen
Infektionen wie Pneumococccen-Infektionen, Staphylococccen-
Infektionen, Streptococccen-Infektionen, Enterococccen-
30 Infektionen, Diphtherie, andere Corynebakterien-Infektionen,
Anthrax, Listeria monocytogenes-Infektionen, Tetanus,
Botulismus, Gasbrand, Antibiotika-assoziiierter Colitis,
anderen Clostridien-Infektionen, Meningococccen-Infektionen,
Gonococccen-Infektionen, Moraxella (branhamella)
35 catarrhalis-Infektionen, anderen Moraxella species-
Infektionen, Klingella-Infektionen, Haemophilus influenzae-
Infektionen, anderen Haemophilus species-Infektionen,

5 Infektionen durch die HACEK Gruppe, Infektionen durch
andere Gram-negative Bazillen, Legionella-Infektionen,
Pertussis, Infektionen durch Gram-negative Entero-Bazillen,
Helicobacter-Infektionen, Infektionen durch Pseudomonaden
und verwandte Organismen, Salmonellose, Shigellose,
10 Infektionen durch Campylobacter und verwandte Species,
Cholera, Vibrio, Brucellose, Tularaemie, Pest, anderen
Yersinien-Infektionen, Bartonella-Infektionen,
einschließlich Infektionen durch Katzenkratzer, Donovanias
(Granuloma Inguinale), Nocardiose, Actinomykose,
15 Infektionen durch gemischte anaerobe Organismen,
Tuberkulose, Lepra, Infektionen durch nicht-
Tuberkelbakterien, Syphilis, endemische Treponematose,
Leptospirose, Rückfall-Fieber, Lyme Borreliose, Infektionen
durch Rickettsien, Mycoplasmen oder Chlamydien, virale
20 Infektionen wie Herpes simplex Virus-Infektionen, Varizella
zoster-Infektionen, Epstein Barr-Virus-Infektionen,
einschließlich Mononukleose, Cytomegalovirus-Infektionen,
humane Herpesvirus Typ 6, 7 oder 8-Infektionen, Pockenvirus-
Infektionen, Vaccinia-Infektionen, andere Pockenviren-
25 Infektionen, Parvovirus-Infektionen, humane Papillomavirus-
Infektionen, virale Atemwegsinfektionen, Influenza, virale
Gastroenteritis, Enterovirus-Infektionen, Reovirus-
Infektionen, Masern, Röteln, Mumps, Rabies-Virus-
Infektionen, anderen Rhabdovirus-Infektionen, Infektionen
30 hervorgerufen durch Nager- und/oder Arthropodenviren,
Infektionen mit Marburg- und/oder Ebolaviren, pilzlichen
Infektionen wie Histoplasmose, Coccidioidomycosis,
Blastomykose, Cryptococcose, Candidiasis, Aspergillose,
Mucormycosis, verschiedene Mykosen, Prototheca-
35 Infektionen, Pneumocystis carinii-Infektionen, Infektionen
mit Protozoen, wie Amöbenbefall, Infektionen mit frei-
lebenden Amöben, Malaria, Infektionen durch Parasiten von

5 roten Blutzellen, Leishmaniasis, Trypanose, Toxoplasma-
Infektionen, Intestinalinfektionen durch Protozoen,
Trichomonadenkolpitis, Infektionen mit Helminthen, wie
Trichinose, Infektionen mit anderen Gewebe-Nematoden,
Infektionen mit intestinalen Nematoden, Filariose,
10 Infektionen wie Loiasis, Onchozerkose oder Dracontiasis,
Schistosomie, Trematoden-Infektionen oder Cestoden-
Infektionen.

Die Autoimmunkrankheit, die mit dem erfindungsgemäßen
Arzneimittel behandelt oder verhindert wird, ist ausgewählt
15 aus Autoimmunkrankheiten wie allergische Enzephalomyelitis,
autoimmune hämolytische Anämie, autoimmune Thyreoditis
(Hashimoto' Syndrom), autoimmune männliche Sterilität,
pemphigoide Blasensucht, Bauchhöhlenkrankheit, Basedow
Krankheit, Goodpasture-Syndrom, idiopathische
20 thrombocytopenische Purpura, Insulin-resistenter Diabetes
mellitus, Myasthenia gravis, perniziöse Anämie, Pemphigus
vulgaris, Polyarteriitis nodosa, primäre Gallenzirrhose,
Reiter' Syndrom, rheumatisches Fieber, Sarcoidosis,
Sjögren' Syndrom, systematischer Lupus Erythematodes,
25 sympathische Ophthalmia, Multiple Sklerose, und/oder virale
Myocarditis durch Cocksakie B Virus Antwort.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist
ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels umfassend
die erfindungsgemäßen Verfahren, wobei das Arzneimittel
30 Dendritische Zellen enthält, die nach an sich bekannten
Methoden mit Antigenen beladen werden oder mit
entsprechenden Zellen fusioniert werden. Die Dendritischen
Zellen des Arzneimittels werden nach den an sich für
autologe Dendritische Zelltherapien bekannten Verfahren mit
35 einem geeigneten pharmazeutischen Träger formuliert. Das so
gewonnene Arzneimittel kann nach an sich bekannten
Methoden verabreicht werden. Die dendritischen Zellen des

5 Arzneimittels nehmen Antigene auf, prozessieren sie und
 präsentieren Fragmente davon auf ihrer Oberfläche im
 Kontext mit MHC Molekülen und costimulatorischen Molekülen.
 Nach einer weiteren Reifung nach an sich bekannten Methoden
 werden die Zellen in einer geeigneten Formulierung am
 10 Menschen angewandt. Ein weiteres Beispiel ist die Beladung
 reifer dendritischer Zellen nach an sich bekannten Methoden
 des „Pulsing“. Bei den dendritischen Zellen handelt es sich
 um autologe, allogene oder semi allogene dendritische Zellen
 beziehungsweise deren Vorläuferzellen oder Zellen aus
 15 Zelllinien, die die funktionellen Eigenschaften von
 dendritischen Zellen besitzen, die ex vivo nach an sich
 bekannten Methoden entsprechend geeignete Behandlung zur
 Entwicklung und Reifung bekommen.
 In einer bevorzugten Weise werden die Vorläuferzellen wenn
 20 notwendig durch Gabe von geeigneten Faktoren,
 beispielsweise costimulatorischen Faktoren, Cytokinen
 und/oder Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IL-4 und GM-
 CSF zu Zellen gereift, die funktionell und phänotypisch den
 iDC ähnlich sind. Diese Zellen werden mit geeigneten
 25 Antigenen beladen bei Bedarf weiter gereift. Die
 resultierenden beladenen effektiven dendritischen Zellen
 (mDC), sind Zellen, die reifen beladenen dendritischen
 Zellen phänotypisch und funktionell ähnlich sind werden
 bevorzugt zur Prophylaxe oder Therapie von Tumor- oder
 30 Infektionserkrankungen eingesetzt. Alternativ können die
 effektiven dendritische Zellen erst als mDC beladen werden,
 wie beispielsweise für definierte MHC-Klasse Peptide als
 Antigene. Alternativ werden Zellen in den unterschiedlichen
 Vorläufer-, Differenzierungs- und/oder Reifungsstadien mit
 35 DNA oder RNA von Antigenen, costimulatorischen Molekülen
 und/oder Immunogenen nach an sich bekannten
 gentechnologischen Methoden transfiziert werden. Bevorzugt

5 sind dies stabile Transformationen von den Zellen, die sich
am besten teilen lassen, bevorzugt vor dem Vorläuferstadium
vor der Differenzierung. Alternativ werden geeignete
Stadien der erfindungsgemäßen dendritischen Zellen, als
Vorläuferzelle, als unreife Zelle oder als reife Zelle mit
10 anderen Zellen nach an sich bekannten Methoden fusioniert
und gegebenenfalls weiter differenziert und oder gereift. Für
die Behandlung oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen
werden bevorzugt die beladenen Zellen im unreifen Stadium
verwendet, wie weiter oben detaillierter beschrieben wird.

15

Die Erfindung wird durch folgendes Beispiel näher
erläutert, ohne sie auf dieses Beispiel einzuschränken:

Beispiel 1:

20 MUTZ-3, eine humane CD34+, CD124+, CD116+ Zelllinie zur
Herstellung von effektiven DC durch eine Zytokin-induzierte
Differenzierung von dendritischen Zellen aus CD34+
Precursor Zellen und die Verwendung der effektiven DC zur
Induktion funktioneller T-Zell Subsets für die Herstellung
von Immuntherapeutika

25

Material und Methoden

Antikörper und Reagenzien

30 Für die Untersuchungen wurden verwendet:
PE-markierte monoklonale Antikörper (mAK) gegen CD40, CD34
und TCR Valpha 24 von Coulter Immunotech (Marseilles,
France), gegen CD1a, CD54, CD83 und CD86 von Pharmingen
(San Diego, CA) und gegen CD80 von Becton-Dickinson (San
35 Jose, CA)

5 FITC-markierte mAK gegen HLA-DR, TCR V β 11 und CD14 von Becton-Dickinson, gegen CD116 (GM-CSF-Rezeptor) von Pharmingen.

Die CD1d-Expression wurde bestimmt mittels eines murinen mAK gegen CD1d (Mab CD1d27) (Spada et al. 1998, J Exp Med 188(8): 1529-1534) gefolgt von einem FITC-markierten anti-Maus-IgG1 mAK (Pharmingen). Die Isotyp-Kontrolle Maus-IgG1 stammt von Organon Technika-Cappel (Malvern, PA)., FITC- und PE-markierte Simultest-Isotyp-Kontrollen von Becton-Dickinson. Langerin-Expression wurde durch Färbung mit dem mAK DDCM4 gefolgt von einem FITC-markierten anti-Maus-mAK nachgewiesen. Die Blockierung der Antigen-Präsentation über CD1d erfolgte mit dem AK CD1d51 (Spada et al. 1998, J Exp Med 188(8): 1529-1534).

20 Zellkulturen

Die Zytokin-abhängige, humane myelomonozytische Leukämie-Zelllinie MUTZ-3 wurde in MEM-alpha mit Ribonukleosiden und Desoxiribonukleosiden (Gibco, Paisley, UK), Hitze-inaktiviertem FKS, Penicillin/Streptomycin und 10 % konditioniertem Medium der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie 5637 (Quentmeier 1996, Leuk Res (4):343-350) kultiviert. Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten (Costar, Cambridge, MA) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert. Die von einer akuten monozytischen Leukämie abgeleitete Zelllinie THP-1, die von einer akuten myelogenen Leukämie abgeleitete Zelllinie KG-1, die chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie K562, die von einer promyelozytischen Leukämie abgeleitete Zelllinie HL-60 und die Makrophagen-ähnliche histiozytische Lymphomlinie U937 wurden von der Amerikanischen Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) erhalten. Diese Zelllinien wurden in IMDM oder RPMI-1640 mit Hitze-inaktiviertem FKS,

5 Penicillin/Streptomycin, 2M L-Glutamin und beta-Mercaptoethanol kultiviert und zweimal wöchentlich in 80 cm² Gewebekulturflaschen (Costar) passagiert.

Generierung von unreifen (iDC) und reifen DC-ähnlichen (mDC) Zellen aus Leukämiezelllinien

10 Die Induktion eines DC-ähnlichen Phänotyps in Leukämiezelllinien wurde wie folgt erreicht:
Die Zellen wurden gewaschen und mit einer Zelldichte von 1x10⁵/ml (in einem Volumen von 3ml) in 24-Loch-Platten
15 eingesät und für 7 Tage mit GM-CSF (100ng/ml Novartis/Schering-Plough, Arnhem, NL), IL-4 (1000U/ml CLB) und niedrigdosiertem TNFalpha (2,5 ng/ml, CLB, Amsterdam, NL) inkubiert. Am Tag 7 wurde die Reifung induziert durch Gabe von entweder TNFalpha (75ng/ml) oder LPS (100ng/ml,
20 Sigma). Für die Herstellung von LC-ähnlichen Zellen wurden die MUTZ-3-Zellen für 9 Tage in GM-CSF und niedrigdosiertem TNFalpha kultiviert. Die Zellen wurden dann mit oder ohne TGFbeta (1ng/ml, R&D Systems, Abingdon, Oxon UK) und niedrigdosiertem TNFalpha für weitere 7 Tage inkubiert, wobei
25 das Kulturmedium am Tag 2 erneuert wurde. Die dadurch erhaltenen unreifen DC (iDC) wurden auf die Expression von CD1a und Langerin untersucht.

Durchflußzytometrie

30 Die kultivierten Zellen wurden gewaschen und mit einer Zellzahl von 5x10⁴ bis 1x10⁵ in 25 microl eiskaltem FACS-Puffer (PBS pH 7,5, 0,1%BSA, 0,2%Natriumacid) resuspendiert. Die spezifischen und die fluoreszenzmarkierten mAK bzw. die zugehörigen Isotyp-Kontrollen
35 wurden zugegeben und die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen und in 250

5 microl FACS-Puffer resuspendiert. Die markierten Zellen wurden an einem FACStar (Becton Dickinson) unter Verwendung der CellQuest-Software analysiert.

10 **Allogene Gemischte-Lymphozyten-Reaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR)**

Allogene, nichtadhärente PBL wurden mittels Gradientenzentrifugation über Hypaque Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Schweden) aus dem peripheren Blut gesunder Spender
15 isoliert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/Loch in Rundboden-Mikrotiterplatten eingesät und mit einer Verdünnungsreihe an MUTZ-3 DC in 200 microl Kulturmedium für 5 Tage inkubiert. Die T-Zell-Proliferation wurde nach einen 5h-Puls mit ^3H -Thymidin (0,4
20 microCi/Loch, Amersham, Aylesbury, UK) bestimmt (Standardmethoden).

**Induktion von IL-12/p70- und IL-10-Sekretion durch reife
MUTZ-3-DC (MUTZ-3 mDC)**

25 Die MUTZ-3iDC wurden gewaschen und mit einer Zellzahl von 1×10^5 in MEM alpha (Zusätze siehe oben) in 48-Loch-Platten eingesät. Unreife MUTZ-3-DC (MUTZ-3 iDC) wurden durch Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit entweder $\text{IFN}\gamma$ (1000 U/ml, Biosource, Camarillo, CA) oder Dexamethason (1micromol/l, Sigma) (Inkubationszeit 48h) und
30 anschließende Stimulation mit bestrahlten Zellen einer CD40-Ligand-transfizierten J558-Zelllinie (J558-CD40L, 1×10^5 Zellen/Loch) zur Reifung gebracht. Die Konzentrationen der sekretierten Zytokine IL-10 und IL-12 (p70-Untereinheit)
35 wurden mittels ELISA bestimmt.

MUTZ-3-DC wurden mit 100pfu/Zelle eines rekombinanten Adenoviruses infiziert. Dieser Adenovirus kodiert das M1-Matrix-Proteingen des Haeminfluenzavirus' (RAD128). Für die RAD128-Infektion wurden die DC mit serumfreiem Medium gewaschen und mit Lipofectamin (100pfu/Zelle, 1,7microg/1 x 10⁸ pfu) inkubiert. Nach 2h wurden die Zellen mit komplettem Medium gewaschen und dann über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Andere MUTZ-3-DC wurden mit dem HLA-A2.1-bindenden M1-abgeleiteten Peptid M1₅₈₋₆₆ (50µg/ml) über Nacht bei 37°C zusammen mit beta-Mikroglobulin (2,5microg/ml) in serumfreiem Medium beladen. CD8⁺-T-Zellen (Responder) wurden mittels eines CD8-T-Zell-MACS-Isolationskits (Miltenyi Biotec) aus HLA-A2+ PBMC isoliert. Antigen-beladene (Virus oder Peptid) MUTZ-3-DC (Stimulator) wurden mit einem Responder:Stimulator-Verhältnis von 5:1 eingesetzt in komplettem IMDM-Medium mit 10% gepooltem Humanserum (CLB) und 5ng/ml IL-7 (R&D Systems). Nach einer Woche wurde die T-Zellen in einem IFNgamma-ELISPOT-Assay auf Spezifität untersucht. Dazu wurden bestrahlte T2-Zellen, die mit dem HLA-A2.1-bindenden, M1-abgeleiteten Peptid M1₅₈₋₆₆ oder als Kontrolle mit dem HLA-A2.1 bindenden HPV16-E7-abgeleiteten Peptid (E7₁₁₋₂₀) beladen wurden, verwendet. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit dem peptid (50microg/ml) und beta-Mikroglobulin (2,5microg/ml) in serumfreiem Medium beladen.

MUTZ-3-DC wurden mit dem HLA-A2.1-bindenden MART-1-abgeleiteten Peptid (ELAGIGILTV) (10µg/ml) 4 Stunden bei 37°C in serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco) beladen. CD8⁺-T-

5 Zellen (Responder) wurden mittels eines CD8-T-Zell-MACS-
Isolationskits (Miltenyi Biotec) aus HLA-A2+ PBMC isoliert.
Mit MART-1-peptidbeladene MUTZ-3-DC (Stimulator) wurden mit
einem Responder:Stimulator-Verhältnis von 10:1 in
serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco) eingesetzt. Nach einer
10 Woche wurden die T-Zellen in einem IFNgamma-ELISPOT-Assay
auf Spezifität untersucht. Dazu wurden bestrahlte T2-
Zellen, die mit dem HLA-A2.1-bindenden MART-1 Peptid
(ELAGIGILTV) oder als Kontrolle mit dem HLA-A2.1-bindenden,
CEA-abgeleiteten Peptid CEA.78 (IMIGVLGVG) beladen wurden,
15 verwendet. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37°C mit dem
Peptid (1 microg/ml) in serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco)
beladen.

20 **Induktion von CD8⁺-T-Zellen mit Spezifitäten für die Tumor-
Antigene MUC-1 und Asialoglykophorin durch Stimulierung mit
Tumorzelllysaten.**

Die Tumorzelllysate wurden entweder aus Tumorzelllinien
oder aus Primärmaterial hergestellt:, a) Zelllysate aus
Tumorzelllinien wurden mit Hilfe von 4 Runden abwechselndem
25 Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen
nach an sich bekannten Methoden hergestellt.
b) Zelllysate aus solidem Tumorprimärmaterial wurden wie
folgt hergestellt: Solide Tumoren wurden mit Hilfe der
Triple-Enzym Methode behandelt und dadurch
30 Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese Methode ist dem
Fachmann bekannt und wird häufig in verschiedenen Varianten
in den meisten Tumorpathologie-/ Immunologielabors
angewandt. Nach der chirurgischen Entfernung des Tumors
werden alle weiteren Schritte unter aseptischen Bedingungen
35 durchgeführt. Der Tumor wurde in etwa 5 kubikmillimeter
große Stücke zerteilt und in ein Gefäß mit sterilem Triple-
Enzym-Medium (0,1% Kollagenase, 0,002% Desoxyribonuklease,

5 0,01% Hyaluronidase in dem Puffer „Hank's buffered saline“,
HBSS) gegeben. Dies wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit
einem magnetrührer gerührt bis die soliden Gewebsstücke
sich aufgelöst haben. Anschließend wurde über einen
10 Maschenfilter (coarse wire grid) die unverdauten
gewebsstücke abgetrennt und die verbliebenen Zellen nach
sorgfältigem Waschen in HBSS mit einem Ficoll Gradienten
zentrifugiert, um Monozyten und Lymphozyten von der
Tumorzellsuspension zu trennen. Die Tumorzellen wurden
anschließend mit Hilfe von 4 Runden abwechselndem Frieren
15 in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen lysiert.

MUTZ-3-DC wurden mit einem Tumorzelllysate über Nacht bei
37°C in serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco) beladen. CD8⁺-T-
Zellen (Responder) wurden mittels eines CD8-T-Zell-MACS-
20 Isolationskits (Miltenyi Biotec) aus HLA-A2+ PBMC isoliert.
Mit Tumorzelllysatebeladene MUTZ-3-DC (Stimulator) wurde mit
einem Responder:Stimulator-Verhältnis von 10:1 in
serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco) eingesetzt. Nach einer
Woche wurde die T-Zellen in einem IFNgamma-ELISPOT-Assay
25 auf Spezifität untersucht. Dazu wurden Antigen-beladene
MUTZ-3-DC oder Peptid-beladene T2-Zellen verwendet. MUTZ-
3-DC wurden über Nacht bei 37°C in serumfreiem AIM-V-Medium
(Gibco) mit einem Tumorzelllysate oder mit Asialoglykophorin
(Protein) beladen. T2-Zellen wurden mit dem HLA-A2.1-
30 bindenden MUC1-Peptid MUC-1.2(LLLLTVLTV) 4 Stunden (1
microg/ml) in serumfreiem AIM-V-Medium (Gibco) beladen.

IFNgamma- ELISPOT-Assay

Multiscreen-96-Loch-Filtrationsplatten (Millipore,
35 Molsheim, Frankreich) wurden für 3h bei Raumtemperatur (RT)
oder über Nacht bei 4°C mit dem mAK 1-D1K (50microl,
15microg/ml) in filtriertem PBS (Mabtech, Nacka, Schweden)

5 beschichtet. Die Platten wurden 6-mal mit serumfreiem
Medium gewaschen und anschließend mit filtriertem
kompletten Medium mit 10% FKS für 0,5-1h bei RT blockiert.
Anschließend wurden $7,5 \times 10^3$ bis 1×10^5 Effektorzellen/Loch
mit 1×10^4 Zielzellen über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.
10 Die Zellen wurden verworfen und die Platten 6-mal mit
filtriertem PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Zu jedem Loch
wurden dann 50µl mAK 7-B6-1 (1µg/ml in filtriertem
PBS) hinzugefügt und die Platten für 2-4h bei RT
stehengelassen. Nach 6 Waschschritten mit filtriertem
15 PBS/0,05% Tween 20 wurden 50µl/Loch Streptavidin-
gekoppelte Alkalische Phosphatase (1:1000 verdünnt in PBS)
zugegeben und die Platten für 1-2h bei RT inkubiert. Nach 6
weiteren Waschschritten mit filtriertem PBS/0,05% Tween 20
wurden 50µl Alkalische-Phosphatase-Reagenz (AP
20 conjugate substrate kit, Biorad, Hercules, CA) zugesetzt
und 15 min bis 1h stehengelassen, bis sich Farbpunkte
entwickelt haben. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser
gestoppt und die Farbpunkte von 2 unabhängigen Personen
ausgezählt.

25

Aktivierung von Tetanus-Toxoid(TT)-spezifischen T-Zellen
PBMC von Spendern mit partieller HLA-Übereinstimmung (HLA-
DR11, HLA-DQ7, HLA-B44 und HLA-A2 exprimierend) wurden
ausgewählt und die CD4⁺-PBL mittels MiniMACS-
30 Separationssäulen (Miltenyi Biotec) isoliert. Nach 1,5h
Adhärenz an die Plastikoberfläche, um kontaminierende APC
zu entfernen, wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe
TT-gepulster, unreifer MUTZ-3-DC (50µg/ml, Biltoven, NL,
12h in serumfreiem Medium) in 200µl Medium für 7 d bei
35 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die T-Zell-Proliferation wurde
nach einem 5h-Puls mit ³H-Thymidin (0,4 µCi/Loch,
Amersham, Aylesbury, UK) bestimmt (Standardmethoden).

5

Präsentation von α -Galactosylceramid für

V α 24⁺/V β 11⁺-NKT-Zellen

Valpha24⁺-T-Zellen, einschließlich Valpha24⁺/Vbeta11⁺-NKT-Zellen, wurden durch Positivselektion aus PBL gewonnen
10 mittels autoMACS (Miltenyi Biotec). Die aufgereinigten NKT-Zellen wurden dann für 7 Tage mit unreifen oder reifen MUTZ-3-DC, die mit DMSO (Vehikelkontrolle) oder 100ng/ml alpha-Galactosylceramid (alpha-GalCer, Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery, Japan) gepulst worden
15 waren, kokultiviert unter der Zugabe von 10ng/ml rekombinantem humanen IL-7 (R&D Systems) und 10 ng/ml rekombinantem humanen IL-15 (R&D Systems) sowie mit bzw. ohne blockierende Anti-CD1d-Antikörper (CD1d51, 10microg/ml). Die absolute Zahl an NKT-Zellen und der
20 Expansionsfaktor wurden mittels FACS-Analysen bestimmt.

Ergebnisse

Differenzierung der MUTZ-3 Zellen zu effektiven DC
25 **unterschiedlicher Differenzierungsstadien und Effektorstadien**

MUTZ-3-Zellen erwerben nach Zytokingabe den Phänotyp unreifer DC-
30

Als erstes bestimmten wir das Potential leukämischer Zelllinien zu differenzieren in Anwesenheit von Zytokinen, die routinemäßig für die Induktion von DC Zellen verwendet werden. Insbesondere untersuchten wir die mit Zytokinen
35 behandelten Zelllinien, ob die Expression von CD1a, einem Hauptcharakteristikum für unreife dendritische Zellen

5 (iDC), auf der Oberfläche der Zellen induziert wurde. Drei
der sechs getesteten Zelllinien (MUTZ-3, KG-1, THP-1)
reagierten auf den Zytokin-Cocktail GM-CSF, IL-4 und
niedrigdosierte TNF α . Der Anteil CD1a-positiver Zellen
nach 7 Tagen in Kultur war am höchsten bei der Zelllinie
10 MUTZ-3 (20%), während die Zelllinien KG-1 und THP-1 10%
bzw. 5% CD1a-positiv aufwiesen (Tabelle 1). Bei
diesen letzten zwei Zelllinien ging die Differenzierung mit
einer deutlichen Expression des DC-Reifungsmarkers CD83
einher, was frühere Ergebnisse bestätigt (Hulette et al.
15 2001, Arch Dermatol Res 293(3):147-158; St Louis et al.
1999, J Immunol 162(6):3237-3248).
KG-1 und THP-1 reagierten nicht auf weitere Zytokin-
Stimuli, auch konnte keine weitere Änderung des CD1a/CD83-
Phänotyps beobachtet werden. Auf den übrigen 3
20 untersuchten Zelllinien wurden weder CD1a noch CD83
detektiert. Alle getesteten Zelllinien exprimierten den GM-
CSF-Rezeptor (CD116), aber nur die Zelllinie MUTZ-3 auch
den IL-4-Rezeptor (CD124). Das zeigt die einzigartige
Fähigkeit von MUTZ-3 Zellen, CD1a positiv zu werden ohne
25 gleichzeitig auch CD83 zu exprimieren, d.h. den iDC
Phänotyp zu erwerben.

*MUTZ-3 ist ein CD34-positives DC-Differenzierungsmodell,
30 das von Vorläuferzellen abgeleitet ist*

Neben der Neo-Expression von CD1a wurden weitere
morphologische und phänotypische Veränderungen nach der
Zytokin-Stimulation von MUTZ-3 Zellen beobachtet. MUTZ-3
35 Zellen waren typischerweise nicht-adhärenz, runde oder ein
wenig gelappte Zellen. Nach der Differenzierung waren die
MUTZ-3 iDC Zellen nur noch locker adhärenz, bildeten

5 Klumpen aus großen Zellen und entwickelten haarähnliche, zytoplasmatische Projektionen, ein morphologisches Charakteristikum von DC Zellen (Fig. 1a, b). Die Analyse der Zelloberflächen-Marker zeigte, daß unstimulierte MUTZ-3-Zellen CD14, CD86, CD54 und CD40

10 schwach exprimieren und CD34 und HLA-DR stark (Fig. 2 und 3). Nach Induktion der CD1a Expression auf der Zelloberfläche wurde eine herunter-regulierte CD14- (Monozytenmarker) und CD34-Expression (Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen) beobachtet. Die

15 Expression der co-stimulatorischen und Adhäsions-Moleküle CD80, CD86, CD40, CD54 und HLA-DR war stark herauf-reguliert auf den MUTZ-3 iDC Zellen im Vergleich zur unstimulierten Zellpopulation (Fig.3). Die Stimulation der MUTZ-3 iDC Zellen mit TNF α induzierte die Expression des

20 DC-Reifungsmarkers CD83 mit einer weiteren Steigerung der CD1a Expression von und allen co-stimulatorischen Molekülen. Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, wenn die MUTZ-3 iDC Zellen mit LPS, CD40-Ligand-transfizierten J558 Zellen oder PolyIC zur Reifung gebracht wurden (Ergebnisse

25 werden nicht gezeigt). Keine weitere Proliferation wurde beobachtet, wenn zu den MUTZ-3 iDC oder reifen DC (mDC) Zellen Zytokine zugegeben wurden. MUTZ-3 Zellen können demzufolge unter dem Einfluß von GM-CSF, IL-4 und niedrigdosiertem TNF α in DC Zellen

30 differenzieren (MUTZ-3-DC), wobei sie zwei verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen - einen unreifen (MUTZ-3 iDC) und einen reifen Phänotyp (MUTZ-3 mDC).

Die Herab-Regulation von CD34 und CD14 deutet daraufhin,

35 dass MUTZ-3 Zellen eine Population von Vorläuferzellen bei der Differenzierung von CD34-positiven Stammzellen

5 darstellt. Bei der Differenzierung von CD34-positiven Stammzellen entstehen wenigstens zwei Vorläuferzelltypen, welche ultimativ zu interstitialen und Langerhans' Zellen (LC) reifen. Um zu bestimmen, ob sich MUTZ-3 Zellen zu LC ähnlichen Zellen entwickeln können, haben wir MUTZ-3 Zellen
10 in An- oder Abwesenheit von TGFbeta1 kulti-viert. TGFbeta1 ist bekannt dafür bei DC Zellen, die von CD34-positiven Zellen abstammen, einen LC-Phänotyp zu induzieren (Caux et al. 1997, Blood 90 (4): 1458-1470). Wir beobachteten, dass unter dem Einfluß von TGFbeta1 nicht nur der Anteil an CD1a
15 positiven MUTZ-3 Zellen von 20% auf 80% anstieg, sondern auch eine starke Langerin / CD1a Doppelfärbung auftrat(Fig. 4). Letzteres zeigt, dass diese Zellen bestimmte Charakteristika von LC Zellen aufweisen.

20 *MUTZ-3 DC Zellen induzieren die Proliferation von allogenen Lymphozyten*

MUTZ-3 mDC Zellen waren in der Lage in gemischten Lymphozyten-Reaktionen die Proliferation von allogenen T-
25 Zellen zu stimulieren, und zwar zu einem höheren Grad als MUTZ-3 iDC oder unstimulierte MUTZ-3 Zellen. Es wurde ein 6-10 fach höherer [³H]-Thymidin Einbau (Lymphozyten Proliferation) verglichen mit unstimulierten MUTZ-3 Zellen und ein 2-3 fach höherer [³H]-Thymidin Einbau verglichen
30 mit MUTZ-3 iDC Zellen gemessen bei einem MUTZ-3/PBL Verhältnis von 40:1 (Fig. 5). Wahrscheinlich spiegelt diese erhöhte stimulatorische Eigenschaft von MUTZ-3 mDC verglichen mit MUTZ-3 iDC Zellen den beobachteten Anstieg der Expression der co-stimulatorischen und Adhäsions-Marker
35 CD80, CD86, CD40 und CD54 wider (wie in Fig.3 gezeigt).

5 *MUTZ-3 DC Zellen reagieren auf Th-polarisierende Stimuli und bekommen einen DC1 oder DC2 Phänotyp während der Reifung*

DC Zellen können IL-12 sekretieren, einem potenten Typ 1 T-Zellen induzierenden Zytokine (Kalinski et al 1998, J Immunol 161 (6): 2804-2809). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass unter dem Einfluß gewisser Stimuli nicht-vorprogrammierte iDC Zellen die Fähigkeit erhalten, hauptsächlich IL-12 (DC1 Phänotyp) oder das Typ 2 induzierende Zytokine IL-10 (DC2 Phänotyp) zu sekretieren (Vieira et al. 2000, J Immunol 164 (9): 4507-4512; Langenkamp et al. 2000, Nat Immunol 1 (4): 311-316). Um zu untersuchen, ob MUTZ-3 iDC Zellen den DC1 oder DC2 Phänotyp entwickeln können, wurde die Reifung der MUTZ-3 iDC Zellen in Anwesenheit von IFN-gamma oder Dexamethason induziert. Wenn MUTZ-3 mDC Zellen (nach Reifung in Anwesenheit von TNFalpha) mit oder ohne CD40 Liganden transfizierten J558 Zellen stimuliert wurden, wurden geringe Mengen an IL-10 und IL-12 produziert (Fig. 6). Demgegenüber ergab die Reifung von MUTZ-3 iDC Zellen in Anwesenheit von IFN-gamma eine IL-12 Produktion, die darüber hinaus kräftig anstieg, wenn die Zellen durch die transfizierten J558 Zellen weiter stimuliert wurden (Post-Maturation). Ganz im Gegensatz dazu wurde überhaupt kein IL-12 von MUTZ-3 mDC Zellen produziert, wenn diese in Anwesenheit von Dexamethason zur Reifung gelangten. In diesen Zellkulturen konnte aber eine erhöhte IL-10 Produktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter geeigneten Bedingungen nicht-vorprogrammierte MUTZ-3 DC Zellen zum DC1 oder DC2 Phänotyp verändert werden können.

5 ***MUTZ-3 Zellen als effektive DC, die die Fähigkeit besitzen
Antigene zu prozessieren und zu präsentieren und eine
Immunantwort zu induzieren***

10 Eine zentrale Funktion von DC Zellen als professionelle
Antigen präsentierende Zellen (APC) ist ihre Fähigkeit,
CD4- und CD8-positive T-Zellen zu stimulieren, sowie (wie
erst kürzlich gezeigt) Lipide und hydrophobe Antigene NKT
Zellen zu präsentieren. Deshalb haben wir untersucht, ob
15 spezifisch Antigene zu prozessieren und zu präsentieren.

*MUTZ-3 DC Zellen aktivieren Influenza-spezifische,
zytotoxische T-Lymphozyten über MHC Klasse I*

20 Die molekulare Typisierung ergab, daß MUTZ-3 Zellen positiv
waren für die HLA Antigene HLA-A2, HLA-A3, HLA-B44, HLA-
DR10, HLA-DR11, HLA-DR52, HLA-DQ5 und HLA-DQ7. Die HLA-A2
Expression wurde bestätigt durch eine FACS-Analyse unter
Verwendung der monoklonalen Antikörper MA2.1 und BB 7.1
25 (Ergebnisse nicht gezeigt). Wir haben nun untersucht, ob
MUTZ-3 DC Zellen fähig sind, Antigene über das HLA-A2
Klasse I Molekül zu prozessieren und zu präsentieren. MUTZ-
3 DC Zellen wurden beladen mit dem immunodominanten A2
bindenden M1 Häminfluenza (flu) Peptid oder die Zellen
30 wurden mit Adenoviren infiziert, die für die gesamte M1
Sequenz kodieren (um die Fähigkeit zur HLA Klasse I
Prozessierung zu testen). In beiden Fällen wurden T2
Zellen, die mit dem M1 flu Peptid oder als Kontrolle mit
dem vom HPV-abstammenden E7 Peptid beladen wurden, als
35 Stimulator-Zellen im IFNgamma-ELISPOT Assay für
zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) benutzt, welche bei der
Co-Kultivierung von MUTZ-3 DC und T-Zellen entstanden sein

5 könnten. Unstimulierte T-Zellen wurden hinzugefügt, um die
Basislinie der flu-spezifischen CTL Reaktion zu bestimmen.
Keine spezifische CTL Antwort wurde unter diesen
Bedingungen beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine
HLA-A2 beschränkte, flu-spezifische CTL Expansion konnte
10 detektiert werden nach Co-Kultivierung der CTL mit MUTZ-3
DC Zellen, die entweder mit dem flu Peptid beladen waren
oder mit den M1 kodierenden Adenoviren infiziert worden
waren (Fig. 7a 1,2). Diese Ergebnisse zeigen, daß MUTZ-3 DC
Zellen flu Peptide prozessieren und präsentieren können,
15 was zu einer Stimulation von flu spezifischen, MHC Klasse
I-beschränkten CTL führt.

*MUTZ-3 DC Zellen induzieren MART-1-spezifische,
zytotoxische T-Lymphozyten über MHC-Klasse I*

20

Eine HLA-A2-abhängige, MART-1-spezifische CTL-Expansion und
-Aktivierung (IFN γ -Sekretion) konnte detektiert werden
nach Ko-kultivierung der CTL mit MUTZ-3-DC, die mit dem
modifizierten MART-1 Peptid ELAGIGILTV beladen wurden (Fig.
25 9). Diese Ergebnisse zeigen, daß MUTZ-3-DC über MHC Klasse
I naive CTL sensibilisieren können.

30

*Tumorzelllysate-beladene MUTZ-3-DC induzieren zytotoxische
T-Lymphozyten die für verschiedene Tumorantigene spezifisch
sind*

35

HLA-A2-abhängige, Tumorzelllysate-spezifische CTL-Expansion
und -Aktivierung (IFN γ -Sekretion) konnte detektiert werden
nach Ko-Kultivierung der CTL mit MUTZ-3-DC, die mit
Tumorzelllysate beladen wurden (Fig 10). Diese CTL konnten
auch durch Restimulation mit MUC1-Peptid LLLLTVLTV, und

5 durch Restimulierung mit dem Protein Asialoglykophorin aktiviert werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß MUTZ-3-DC eine polyspezifische zelluläre Anti-Tumor-Immunantwort induzieren können.

10 **Generierung von unreifen Mutz-3 (iDC) aus Vorläuferzellen mit GM-CSF, TNF-alpha und verschiedenen IL-4 Konzentration oder IL-13**

Mutz-3 Zellen aus der laufenden Kultur wurden 2 mal mit PBS
15 gewaschen und mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/mL in einem Volumen von 5 mL Kulturmedium in eine 6-Lochplatte eingesät und für 7 Tage mit GM-CSF (1000 U/mL, Leukomax /Novartis), und niedrigdosiertem TNFalpha (2,5 ng/mL, Peprotech) und verschiedenen IL-4 Konzentrationen (zwischen
20 0,1 U/mL und 1000 U/mL, Peprotech) inkubiert. In einem weiteren Versuch wurde IL-4 durch IL-13 (100 ng/mL) ersetzt. Diese Konzentration entspricht etwa der 40-fachen Konzentration verwendeten IL-4 Konzentration (100U/ml). Jeden zweiten bis dritten Tag erfolgte ein
25 Zytokinzufütterung. Nach 7 Tagen Inkubation erfolgte eine durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellen. (siehe Fig. 11 und 12)

30 *Stimulation von TT spezifischen, CD4-positiven T-Zellen durch TT-gepulste MUTZ-3 iDC Zellen*

Die Fähigkeit der Prozessierung von Peptiden über den MHC Klasse II Weg, wurde untersucht, indem MUTZ-3 iDC Zellen mit Peptiden gepulst beladen wurden, die von dem „common
35 recall“ TT Antigen stammten, und anschließend mit allogenen CD4-positiven, teilweise im HLA-Typ übereinstimmenden T-Zellen co-kultiviert wurden. Es wurde eine starke

5 Stimulation der TT spezifischen CD4-positive T-Zellen
beobachtet, wenn MUTZ-3 iDC Zellen mit TT Peptiden im
Vergleich zum Vehicle als Kontrolle gepulst beladen wurden,
wobei die Kontrollwerte ähnlich niedrig waren wie für CD4-
positive Zellen alleine (Fig. 7b). Diese Ergebnisse zeigen,
10 dass MUTZ-3 Zellen in der Lage sind, Antigene über den MHC
Klasse II Weg zu prozessieren und zu präsentieren.

*Glykolipid Präsentation durch MUTZ-3 DC Zellen für
Valpha24-positive / Vbeta11-positive NKT Zellen*

15 CD1 Moleküle repräsentieren eine spezialisierte Klasse von
Antigen präsentierenden Molekülen, welche in der Lage sind,
Lipide, Glykolipide und hydrophobe Peptide zu präsentieren.
Es konnte gezeigt werden, dass das Glykolipid α -GalCer über
20 CD1d Va24-positiven / V β 11-positiven NKT Zellen präsentiert
werden kann (Brossay et al. 1998, J. Exp. Med. 188 (8):
1521-1528). Um zu untersuchen, ob MUTZ-3 DC Zellen in der
Lage sind, α -GalCer zu präsentieren, haben wir zunächst
gezeigt, daß MUTZ-3 DC Zellen das CD1d Molekül exprimieren
25 (Ergebnisse nicht gezeigt). MUTZ-3 iDC und mDC Zellen
wurden dann beladen mit dem α -GalCer oder Vehicle und co-
kultiviert mit gereinigten NKT Zellen für 7 Tage in
Anwesenheit von 10 ng/ml IL-7 und IL-15 (van der Vliet et
al. 2001, J. Immunol. Methods 247 (1-2): 61-72). α -GalCer
30 beladene MUTZ-3 mDC Zellen konnten besser NKT Zellen
induzieren als MUTZ-3 iDC Zellen (sowohl α -GalCer als auch
Vehicle-beladen) und Vehicle beladene MUTZ-3 mDC Zellen.
Die Aufhebung der Antigen Präsentation durch Blockierung
von CD1d bestätigte die Schlussfolgerung, daß MUTZ-3 mDC
35 Zellen in der Lage sind, Glykolipid Antigene über die

5 nicht-klassischen Antigen präsentierenden CD1d Moleküle zu präsentieren (Fig.. 8).

Legenden

10 **Tabelle 1. FACS Analyse der CD1a und CD83 Expression in Leukämia Zelllinien.** Die CD1a und CD83 Expression wurde in der Durchflußzytometrie untersucht nach 7 Tagen Inkubation mit den Zytokinen. Bei MUTZ-3 Zellen ist eine Neo-
Expression von CD1a aber nicht von CD83 zu beobachten. Eine
15 geringere Induktion der CD1a Expression mit assoziierter CD83 Expression wurde für KG-1 und in einem noch geringeren Maße auch für THP-1 Zellen gemessen. ^aPositive Zellen repräsentiert die gesamte Zahl an Zellen, die für einen bestimmten CD-Marker positiv gefärbt waren, innerhalb einer
20 abgegrenzten („gated“) Zellpopulation. ^b Zellen, die mit PE-konjugierten anti CD1a und FITC-konjugierten anti CD83 monoklonalen Antikörpern gefärbt wurden, repräsentieren Doppel-positive Zellen. ^c Zellen wurden mit FITC-konjugiertem anti CD116 monoklonalen Antikörpern gefärbt. ^d
25 publiziert in Drexler, H.G. 2001, The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, Academic Press.

Figur 1. Mikroskopische Aufnahmen von differenzierten MUTZ-3 Zellen nach Zugabe von Zytokinen. a) Unstimulierte MUTZ-3
30 Zellen, b) MUTZ-3 iDC nach 7 Tagen Kultur in Anwesenheit von GM-CSF, IL-4 und geringen Konzentrationen von TNFalpha. Die Zellen sind nur noch locker adhären und zeigen eine dendritische Morphologie (40 fache Vergrößerung).

5 **Figur 2. MUTZ-3 DC zeigen Charakteristika für unreife und reife DC in Anwesenheit von Zytokinen.** Die Scatter Plot Darstellung illustriert den Phänotyp a) der unstimulierten MUTZ-3 Zellen, b) der unreifen MUTZ-3 iDC und c) der TNFalpha induzierten reifen MUTZ-3 mDC. Die Zahlen beziehen sich auf den Prozentsatz der Zellen, die positiv sind für
10 den jeweiligen CD Marker. Alle Zellen wurden mit PE- oder FITC-konjugierten, Antigen spezifischen, monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für fünf Experimente ist.

15 **Figur 3. Die Differenzierung der MUTZ-3 Zellen ist assoziiert mit der Induktion der Expression von co-stimulatorischen Molekülen.** Die FACS Analyse ergibt eine Induktion der co-stimulatorischen Moleküle CD86 und CD40, des Adhäsions-Moleküls CD54 und des HLA Klasse II Moleküls
20 HLA-DR während der MUTZ-3 Differenzierung, unstimulierte MUTZ-3 (gepunktete Linie), unreife MUTZ-3 iDC (durchgezogene Linie) und reife MUTZ-3 mDC (durchgezogenen dicke Linie). Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für fünf Experimente ist.

25 **Figur 4. TGFbeta1 induziert die Expression des LC-assoziierten Oberflächenmoleküls Langerin auf MUTZ-3 Zellen.** CD34-positive MUTZ-3 Zellen wurden zunächst in Anwesenheit von GM-CSF/TNFalpha und anschließend in An- oder Abwesenheit von TGFbeta1 kultiviert. Die Zahlen in der
30 oberen linken Ecke beziehen sich auf den Prozentsatz an CD1a/Langerin doppel-positiven Zellen innerhalb einer abgegrenzten („gated“) Zellpopulation bzw den Prozentsatz an Zellen, die zur Kontrolle mit einem isotypischen
35

5 Antikörper gefärbt wurden. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für drei Experimente ist.

Figur 5. Die Fähigkeit von MUTZ-3 Zellen, Lymphozyten zu stimulieren. Unstimulierte MUTZ-3, unreife MUTZ-3 iDC und reife MUTZ-3 mDC wurden mit Lymphozyten, die im MHC nicht übereinstimmten, co-kultiviert in einer allogenen gemischten Lymphozyten Reaktion. MUTZ-3 mDC wiesen eine starke stimulatorische Kapazität auf verglichen mit unstimulierten MUTZ-3 Zellen (6,3 fache Differenz im [3H] Thymidin Einbau verglichen mit unstimulierten Zellen) und eine 2,3 fache Differenz verglichen mit MUTZ-3 iDC. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für vier Experimente ist.

20 **Figur 6. Nicht-vorprogrammierte MUTZ-3 iDC Zellen können zum DC1 oder DC2 Phänotyp verändert werden während der Reifung unter Einfluß von IFNgamma oder Dexamethason.** MUTZ-3 iDC, die in Anwesenheit von IFNgamma kultiviert wurden, sekretieren IL-12. Keine IL-12 Produktion kann beobachtet werden, wenn die Zellen mit Dexamethason kultiviert wurden. In ähnlicher Weise sekretieren die Zellen kein IL-10, wenn sie mit IFNgamma behandelt wurden. IL-12 und IL-10 Konzentrationen wurden im ELISA bestimmt. Die Zytokine Konzentrationen sind in pg/ml pro 10^5 Zellen dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für vier individuelle Experimente.

Figur 7. MUTZ-3-Zellen besitzen die Fähigkeit der Antigen-Prozessierung und Präsentation
35 (a) MHC Klasse I Präsentation, MUTZ-3 iDC stimulieren eine flu-spezifische CTL Reaktion durch Präsentation des auf das

HLA-A2.1 beschränkten flu Peptids. (1) MUTZ-3-DC wurden mit dem HLA-A2.1 bindenden, vom Häminfluenza stammenden Matrixprotein M1₅₈₋₆₆ beladen und co-kultiviert mit CD8-positiven T-Zellen. Zum Nachweis der CTL Proliferation wurde die Produktion von IFN γ durch CTLs gemessen, die mit T2-Zellen als Ziel-Zellen co-kultiviert wurden. Die T2-Zellen waren entweder mit dem M1 flu Peptid (schwarze Quadrate) oder als Kontrolle mit dem vom HPV16 abstammenden Peptid E7 (weiße Quadrate) beladen. (2) MUTZ-3-DC wurden mit rekombinanten Adenoviren infiziert, die das M1 Matrixprotein Gen enthielten und anschließend co-kultiviert wie oben beschrieben. CTLs wurden dann erneut mit T2-Zellen stimuliert, die entweder mit dem M1 flu Peptid (schwarze Kreise) oder mit E7 Peptid (weiße Kreise) beladen waren. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für drei Experimente ist. (b) MHC Klasse II Antigen Präsentation, MUTZ-3 mDC prozessieren und präsentieren Peptide, die von dem „common recall“ Antigen TT stammen, und stimulieren TT spezifische CD4-positive T-Zellen. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für drei Experimente ist.

Figur 8 . Präsentation von α -GalCer über CD1d. MUTZ-3 iDC wurden mit dem α -GalCer oder als Kontrolle mit Vehikel (DMSO) beladen und anschließend für 48h in An- oder Abwesenheit von höher dosiertem TNF α kultiviert. mDC wurden dann für 9 Tage in Anwesenheit von IL-7 und IL-15 mit oder ohne CD1d blockierenden Antikörper co-kultiviert mit NKT-Zellen, die von gesunden Spendern isoliert worden waren. Die Ergebnisse zeigen die relative Ausbeute von NKT-Zellen nach Co-Kultivierung mit MUTZ-3 iDC und mDC, welche vorher mit Vehikel und α -GalCer beladen wurden, mit oder ohne Blockierung der α -GalCer-Präsentation durch den

5 CD1d-blockierenden Antikörper. Die Daten stammen von einem Experiment, das repräsentativ für drei Experiment ist.

Figur 9 MUTZ-3-DC können naive CTL sensibilisieren.

10 CTL wurden mit MART-1 ELAGIGILTV Peptid-beladene MUTZ-3-DC stimuliert (Prime) und nach eine Woche über Nacht mit MART-1 ELAGIGILTV oder CEA IMIGVLGV Peptid-beladene T2-Zellen restimuliert. Das IFNgamma ELISPOT zeigte eine starke antigenspezifische (MART-1) Aktivierung der CTL, durch Restimulierung mit einem irrelevanten Antigen (CEA) ergab
15 nur eine sehr schwache Aktivierung der Zellen.

Figur 10 MUTZ-3-DC können eine polyspezifische Anti-Tumor-CTL Antwort induzieren.

20 CTL wurden mit Tumorzelllysate-beladene MUTZ-3-DC stimuliert (Prime) und nach eine Woche mit Tumorzelllysate-beladene MUTZ-3-DC, mit Asialoglykophorin-beladene MUTZ-3-DC, oder mit MUC1 LLLLTVLTV Peptid-beladene T2-Zellen restimuliert. Das IFNgamma ELISPOT zeigte starke Aktivierung der CTL
25 durch Restimulierung der Zellen mit Tumorzelllysaten, mit dem MUC-1-Peptid und mit dem Asialoglykophorin.

Figur 11: Mutz-3 Zellen aus der laufenden Kultur wurden für 7 Tage mit GM-CSF (1000 U/mL), niedrigdosiertem TNF-alpha (2,5 ng/mL) und verschiedenen IL-4 Konzentrationen (zwischen 0,1 U/mL und 1000 U/mL) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigender IL-4 Konzentration eine Reduktion der CD124 Expression beobachtet werden kann.

35 **Figur 12:** Mutz-3 Zellen aus der laufenden Kultur wurden für 7 Tage mit GM-CSF (1000 U/mL), niedrigdosiertem TNF-alpha

5 (2,5 ng/mL) und vergleichend mit IL-4 (100 U/mL) oder IL13
(100 ng/mL) inkubiert. Die Konzentration des IL-13
entspricht etwa der 40-fachen Konzentration des verwendeten
IL-4. Die durchflusszytometrische Charakterisierung
10 verschiedener Oberflächenmoleküle zeigt, dass durch eine 7-
tägige Inkubation mit IL-13 anstelle von IL-4, neben GM-CSF
und niedrigdosiertem TNF-alpha, eine vergleichbare
Expression der Oberflächenmoleküle beobachtet werden kann.

15 Im Kontext der Erfindung bedeutet der Ausdruck
„sensibilisieren“, T-Lymphozyten in einen Status versetzen,
in dem sie für einen antigen-spezifische Stimulus
empfindlich sind.

| Zelllinie | % Positive Zellen ^a | Zytokin Rezeptor Expression | | |
|-----------|-----------------------------------|--------------------------------|--|--|
| | | CD1a ^b | CD83 ^b | |
| | | | CD116 (GM-CSF Rezeptor) ^c | CD124 (IL-4 Rezeptor) ^d |
| MUTZ-3 | 38 | 0 | + | + |
| KG-1 | 10 | 10 | + | - |
| THP-1 | 5 | 5 | + | - |
| HL-60 | 0 | 0 | + | - |
| U937 | 0 | 0 | + | - |
| K562 | 0 | 0 | + | - |

20

Tabelle 1: FACS-Analyse der CD1a- und CD83-Expression auf
leukämischen Zelllinien. Die CD1a- und CD83-Expression
wurde mittels Durchflusszytometrie am 7.Tag nach
Zytokingabe untersucht. Die CD1a, jedoch nicht die CD83

- 5 Expression kann in MUTZ-3 Zellen induziert werden. KG-1,
und in einem geringen Ausmaß TH-1, erlangen CD1a(gering)
Expression in Verbindung mit CD83 Expression.
- ^a % positive Zellen repräsentiert die Gesamtzellzahl
positive gefärbter Zellen für einen bestimmten DC-Marker
10 innerhalb einer eingegrenzten Zellpopulation.
- ^b Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD1a und FITC-
markierten anti-CD83 Monoklonalen Antikörpern gefärbt,
dieses Ergebnis repräsentiert doppelt positive Zellen.
- ^c gefärbt mit anti-CD16-FITC-markierten Monoklonalen
15 Antikörpern.
- ^d von Drexler, H.G., 2001. The Leukemia-Lymphoma Cell Line
Facts Book. Academic Press.

20

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien, dadurch gekennzeichnet, dass Zellen von CD124 und CD116 positive Zelllinien mit
10 mindestens einem stimulatorischen Moleküle, zeit gleich oder sequentiell zeit versetzt, in Kontakt gebracht und die effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien erhalten werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als effektive dendritische Zellen oder Zelllinien Zellen oder Zelllinien hergestellt werden, die phänotypisch interstitiellen dendritischen Zellen, Langerhans' dendritischen Zellen, CD83 positiven Zellen, unreifen
15 dendritischen Zellen und/oder reifen dendritischen Zellen gleichen oder ähnlich sind.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
20 die CD124 und CD116 positiven Zelllinien oder Zellen CD34 positiv sind.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die CD116 und CD124 positiven
30 Zelllinien aus Tumorzellen oder Primärzellen gewonnen werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in die CD116 und CD124
35 positiven Zelllinien das Gen für CD34 eingebracht wird

- 5 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die CD116 und CD124 positiven
Zelllinien durch Einbringen von CD116 und/ oder CD124
Genen in Tumorzellen oder Primärzellen gewonnen werden.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinien aus Tumorzellen
oder Primärzellen aus Leukämiepatienten gewonnen werden,
insbesondere von Patienten mit chronischer myeloischer
Leukämie oder akuter myeloischer Leukämie.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinien myeloiden,
lymphoiden, plasmacytoiden oder monocytären Ursprungs sind.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass in die Zelllinien weitere Gene
eingebracht werden, die beispielsweise Rezeptoren oder
Inhibitoren für stimulatorische Moleküle codieren und/oder
25 exprimieren.
- 30 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass in die Zelllinien mindestens
ein Immuntherapeutikagen eingebracht werden.
- 35 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinien mit anderen
Zellen oder Zelllinien fusioniert werden.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass

5 als CD124 und CD116 positive Zelllinien, die Zelllinien
MUTZ-3, MUTZ-2, ME-180, BT-20, HTB-38, TF-1, IGROV-1, Pa-1,
SCCHN Zelllinien, weitere MUTZ Zelllinien, CCL185, C94,
A2774, Daudi, CCL187, SW403 und ihre Zellen verwendet
werden.

10 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als CD124 und CD116 positive Zelllinie die Zelllinie MUTZ-3
und ihre Zellen verwendet werden.

15 14. . Verfahren nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
als die stimulatorischen Moleküle chemische oder
biologische Moleküle verwendet werden, die eine
20 Differenzierung der Zellen der Zelllinien beeinflussen.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als die stimulatorischen Moleküle Cytokine und/oder
25 costimulatorische Moleküle verwendet werden.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als die stimulatorischen Moleküle GM-CSF, TNF-alpha, LPS,
30 PGE2, CD40 Ligand, poly inosinische-poly cytidylische Säure
(polyIC), Kalzium, PMA, TGFbeta1, IL-7 und/oder IL4
verwendet werden.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
35 dadurch gekennzeichnet, dass
als die stimulatorischen Moleküle Surrogat-Moleküle
verwendet werden, beispielsweise Antikörper oder Peptide.

- 5
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass durch die unterschiedlichen stimulatorischen Moleküle, ihre Dosierung und/oder durch die Reihenfolge des in
- 10 Kontaktbringens effektive dendritische Zelllinien oder Zellen unterschiedlicher Aktivierungs- und/oder Effektorstadien gewonnen werden.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die CD124 und CD116 positiven Zelllinien und/oder die effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien in die Apoptose oder Nekrose gebracht werden, beispielsweise durch Bestrahlung der Zellen.
- 15
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in die CD124 und CD116 positiven Zelllinien und/oder effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien mindestens ein Suizid-Gen eingebracht wird .
- 20
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass durch die unterschiedlichen stimulatorischen Moleküle, ihre Dosierung und/oder Reihenfolge des in Kontakbringens effektive dendritische Zelllinien oder Zellen hergestellt werden, die vom DC Typ 1 oder DC Typ 2 sind.
- 25
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die effektiven dendritischen Zelllinien oder Zellen mit den stimulatorischen Molekülen in Kontakt gebracht und effektive reife dendritische Zelllinien oder Zellen erhalten werden.
- 35

- 5
23. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels umfassend ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22 und Formulieren des Arzneimittels mit einem pharmazeutisch
- 10 verträglichen Träger, wobei das Arzneimittel gegebenenfalls zusätzlich mit einem Adjuvans kombiniert wird.
24. Verwendung der effektiven dendritischen Zelllinien oder Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Immuntherapeutika.
- 15
25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die effektiven dendritischen Zelllinien oder Zellen bestrahlt sind.
26. Verwendung der effektiven dendritischen Zelllinien oder
- 20 Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Aktivierung, Inhibierung oder Modulation des humoralen und/oder zellulären Immunsystems.
27. Verwendung der effektiven dendritischen Zelllinien
- 25 oder Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Stimulierung von NKT Zellen, CD4+ und/oder cytotoxischen T-Lymphocyten.
28. Verwendung der effektiven dendritischen Zelllinien oder
- 30 Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zum prozessieren und/oder präsentieren von Antigenen.
29. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene Peptide, Proteine,
- 35 Lipide, Lipopeptide, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Glykolipide, Glykopeptide, Glykoproteine, phosphorylierte Proteine und/ oder phosphorylierte Peptide sind.

5

30. Verwendung der effektiven dendritischen Zelllinien oder Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Proliferation von Immunzellen.

10

31. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Immuntherapeutika allogene und/oder semi-allogene eingesetzt werden.

15

32. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Prophylaxe von Infektions-, Tumor- und/oder Autoimmunerkrankungen.

20

33. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von Infektions-, Tumor- und/oder Autoimmunerkrankungen.

25

34. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Prophylaxe von Metastasen oder Mikrometastasen.

25

35. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von Metastasen oder Mikrometastasen.

30

36. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Prophylaxe von Primärtumoren.

30

37. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von Primärtumoren.

35

38. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von minimal residuellen Tumorerkrankungen.

- 5 39. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien mit mit einem oder mehreren
Tumorantigenen oder Teilen davon beladen werden.
- 10 40. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass effektiven dendritischen Zellen
oder Zelllinien mit Tumorzelllysaten beladen werden.
- 15 41. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien mit Tumorzellen oder Tumorzelllinien
fusioniert werden.
- 20 42. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass in die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien Gene eingebracht werden, die
Tumorantigene codieren.
- 25 43. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche als
Vakzine für Infektionserkrankungen.
- 30 44. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass in die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien Gene eingebracht werden, die
Virusantigene, Bakterienantigene oder Parasitenantigene
oder Teile davon codieren oder andere Gene eingebracht
werden, die für infektiöse Partikel oder Teile derer
codieren.
- 35 45. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien nach Infektion der Zellen oder

5 Zelllinien mit infektiösen Partikeln oder abgeleiteten
Teilen davon, die nicht vermehrungsfähig sind, eingesetzt
werden.

46. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
10 dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien mit Zelllysaten von infizierten
Zellen beladen werden.

47. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
15 dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien mit mindestens einem
Infektionsantigene beladen werden.

48. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
20 dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien mit infizierten Zellen fusioniert
werden.

49. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur
25 Behandlung und/ oder Prophylaxe von rheumatischen
Erkrankungen

50. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche in
der Transplantationsmedizin.

30 51. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet dass die effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien durch mindestens ein
stimulatorisches Molekül weiter differenziert und/oder
35 gereift sind..

5 52. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet dass Zelllinien durch mindestens ein
stimulatorisches Molekül weiter zu effektiven dendritischen
Zellen oder Zelllinien differenziert und/oder gereift
sind..

10

53. Kit umfassend effektive dendritische Zelllinien oder
Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur
Diagnose, Prophylaxe und/oder Behandlung von Infektions-,
Tumor- und/oder Autoimmunerkrankungen.

15

54. Testsystem umfassend effektive dendritische Zelllinien
oder Zellen hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 22
zur Testung von immunaktivierenden, -inhibierenden und/oder
-modulierenden Substanzen und/oder zur Analyse der Biologie
der dendritischen Zelllinien oder Zellen.

20

55. Testsystem umfassend CD124 und CD116 positive
Zelllinien oder Zellen zur Testung von immunaktivierenden,
-inhibierenden und/oder -modulierenden Substanzen und/oder
zur Analyse der Biologie der dendritischen Zelllinien oder
Zellen.

25

56. Testsystem umfassend die MUTZ-3 Zelllinie oder Zellen
zur Testung von immunaktivierenden, -inhibierenden und/oder
-modulierenden Substanzen und/oder zur Analyse der Biologie
der dendritischen Zelllinien oder Zellen.

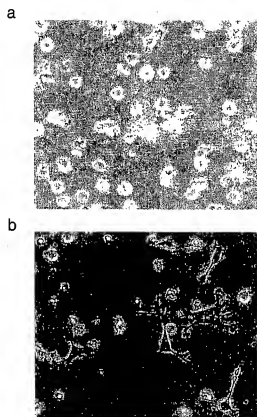
30

35

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

1/12

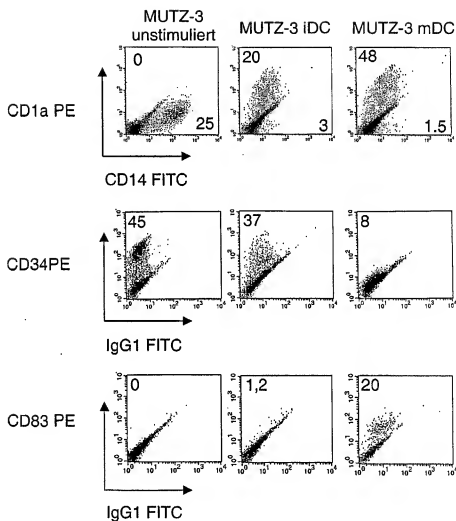


Figur 1

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

2/12

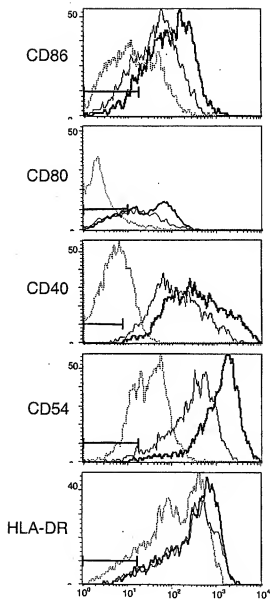


Figur 2

WO 03/023023

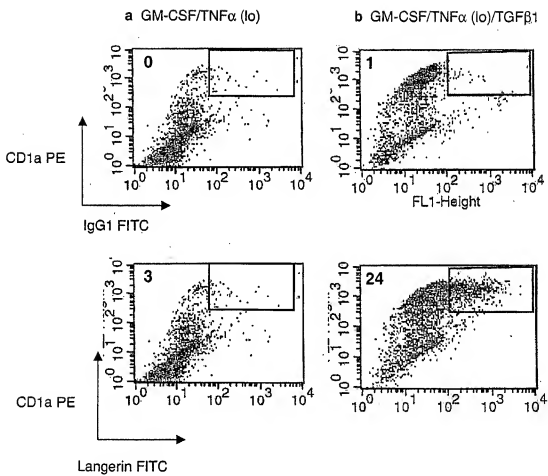
PCT/EP02/09260

3/12



Figur 3

4/12

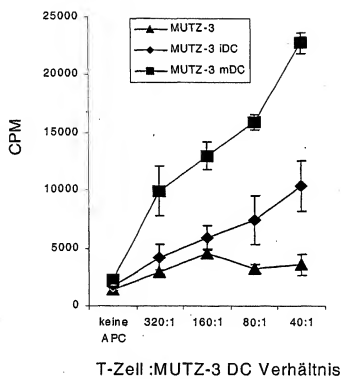


Figur 4

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

5/12

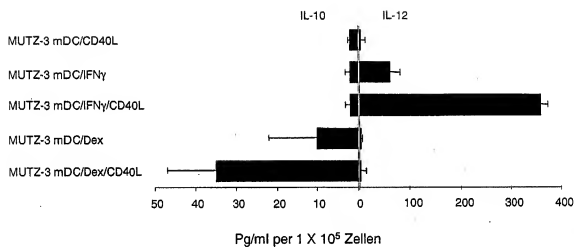


Figur 5

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

6/12

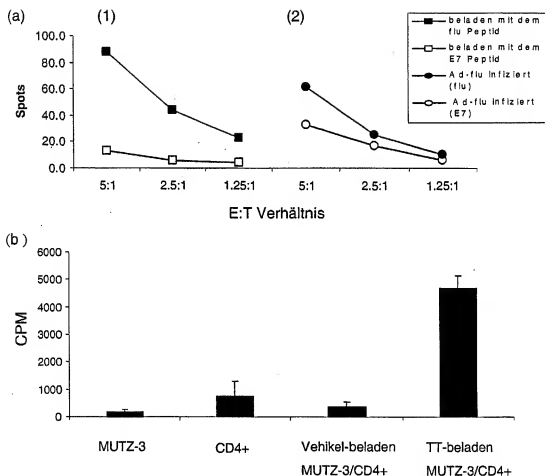


Figur 6

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

7/12

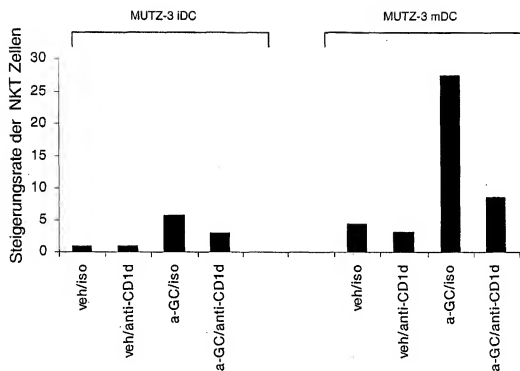


Figur 7

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

8/12

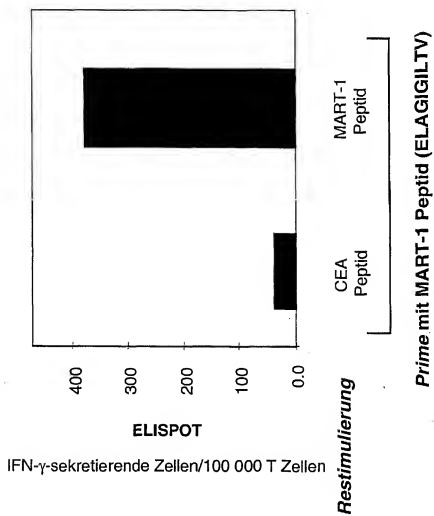


Figur 8

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

9/12

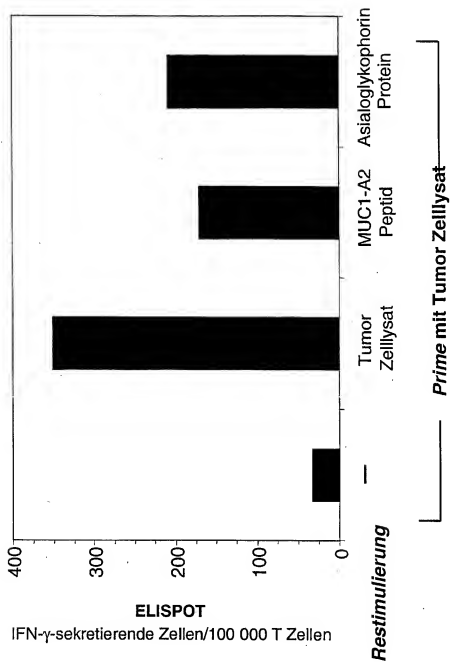


Figur 9

WO 03/023023

PCT/EP02/09260

10/12



Figur 10

WO 03/023023

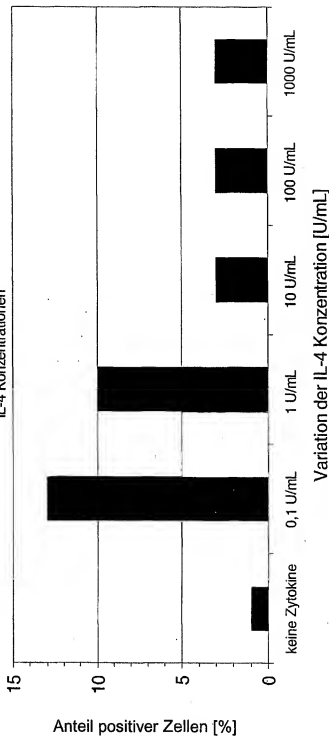
PCT/EP02/09260

11/12

Figur 11: IL-4 abhängige Expression von CD124 (IL-4R α)

Differenzierung von Mutz-3 mit GM-CSF (1000 U/mL), TNF α (2,5 ng/mL) und steigenden

IL-4 Konzentrationen

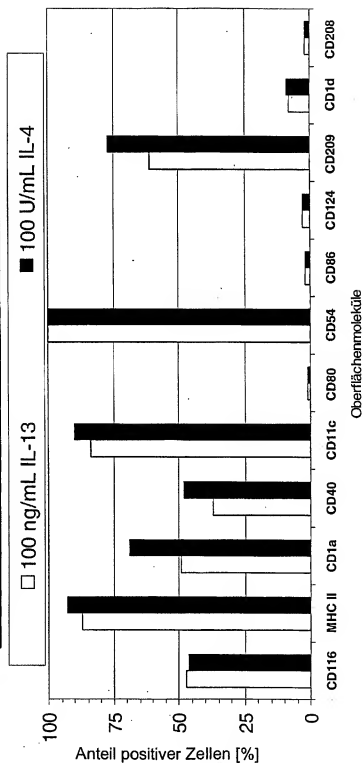


WO 03/023023

PCT/EP02/09260

12/12

Figur 12: Differenzierung von Mutz-3 mit GM-CSF (1000 U/mL),
TNF- α (2,5 ng/mL) und IL-4 (100 U/mL) oder IL-13 (100 ng/mL)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/09260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/08 C12N5/10 A61K35/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X | <p>GEISSMANN FREDERIC ET AL: "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 187, no. 6, 16 March 1998 (1998-03-16), pages 961-966, XP002211123 ISSN: 0022-1007 abstract page 961, left-hand column, paragraph 2 -page 962, left-hand column, paragraph 1 page 962, right-hand column, paragraph 3 -page 963, right-hand column, paragraph 4 page 965, left-hand column, paragraph 2 --- -/-</p> | 1-22 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 2003

Date of mailing of the international search report

10.02.03

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09260

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JAKSITS S ET AL: "CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 NOV 1999, vol. 163, no. 9, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 4869-4877, XP002217762 ISSN: 0022-1767 abstract page 4870, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 5 page 4871, right-hand column -page 4875, right-hand column, paragraph 1; figure 2 | 1-22 |
| X | CAUX CHRISTOPHE ET AL: "Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors" JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL, US, vol. 66, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 781-791, XP001040426 ISSN: 0741-5400 abstract page 781, right-hand column, paragraph 2 -page 782, right-hand column, paragraph 1 page 785, left-hand column -page 787, left-hand column, paragraph 2; figure 5 page 788, left-hand column, paragraph 3 -page 788, right-hand column, paragraph 1; figure 10 | 1-22 |
| X | US 5 811 297 A (GOPAL T VENKAT) 22 September 1998 (1998-09-22) column 3, paragraph 2 -column 4, paragraph 4; examples 6-15 | 1-22 |
| X | US 5 648 219 A (MACKAY VIVIAN L ET AL) 15 July 1997 (1997-07-15) column 2, line 40 -page 47 column 5, line 60 -page 8, line 20 example 6; table 1 | 1-22 |

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09260

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | FAIRCHILD P J ET AL: "Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, vol. 10, no. 23, 30 November 2000 (2000-11-30), pages 1515-1518, XP001104013 ISSN: 0960-9822 abstract page 1515, right-hand column; figures 2,3 page 1518, left-hand column --- | 1-6, 14-16, 18,22 |
| A | PAGLIA P ET AL: "IMMORTALIZED DENDRITIC CELL LINE FULLY COMPETENT IN ANTIGEN PRESENTATION INITIATES PRIMARY T CELL RESPONSES IN VIVO" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 178, no. 6, 1 December 1993 (1993-12-01), pages 1893-1901, XP000572922 ISSN: 0022-1007 abstract page 1894, left-hand column, paragraph 5 -page 1896, right-hand column, paragraph 3 page 1898, right-hand column, paragraph 3 -page 1899, right-hand column --- | 1-22 |
| X | BANCHEREAU J ET AL: "IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC. US, vol. 18, 2000, pages 767-811, XP001018258 ISSN: 0732-0582 page 788, paragraph 2 -page 792, paragraph 2; figure 8 A page 770, paragraph 4 -page 773, paragraph 1; figure 2 --- | 23,24 |
| X | OZAWA HIROAKI ET AL: "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer to dendritic cells or epidermal cells augments their antigen-presenting function including induction of anti-tumor immunity." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 113, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 999-1005, XP002227119 ISSN: 0022-202X abstract page 999, left-hand column -page 1000, left-hand column, paragraph 2 page 1004, right-hand column, paragraph 3 --- | 23,24 |
| -/- | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09260

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | MASTERSON ALLAN J ET AL: "MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors." BLOOD, vol. 100, no. 2, 15 July 2002 (2002-07-15), pages 701-703, XP002217763 July 15, 2002 ISSN: 0006-4971 the whole document ----- | 1-22 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/09260

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See annexe

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-24
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/09260

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-22 – INVENTION 1

method of producing effective dendritic cells or cell lines.

2. Claim 23 – INVENTION 2

method of producing a medicinal drug comprising a method according to one of Claims 1-22 and the formulation of the medicinal drug with a pharmaceutically well-tolerated vehicle.

3. Claims 24-56 – INVENTION 3

use of effective dendritic cell lines as immunotherapeutic agents or for treatment of neoplastic, infectious or autoimmune diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/09260

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| US 5811297 | A | 22-09-1998 | CA 2248555 A1 12-09-1997 |
| | | | EP 0954594 A2 10-11-1999 |
| | | | JP 2000508885 T 18-07-2000 |
| | | | WO 9732992 A1 12-09-1997 |
| US 5648219 | A | 15-07-1997 | AU 3586595 A 27-03-1996 |
| | | | CA 2199377 A1 14-03-1996 |
| | | | EP 0804554 A1 05-11-1997 |
| | | | JP 10505498 T 02-06-1998 |
| | | | WO 9607733 A1 14-03-1996 |
| | | | US 5830682 A 03-11-1998 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/08 C12N5/10 A61K35/28

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | <p>GEISSMANN FREDERIC ET AL: "Transforming growth factor betal, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, Bd. 187, Nr. 6, 16. März 1998 (1998-03-16), Seiten 961-966, XP002211123 ISSN: 0022-1007 Zusammenfassung Seite 961, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 962, linke Spalte, Absatz 1 Seite 962, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 963, rechte Spalte, Absatz 4 Seite 965, linke Spalte, Absatz 2</p> <p>-/-</p> | 1-22 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst ein oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchierbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eingetragt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"V" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Januar 2003

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrunde liegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nehmend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Abschließendes des internationalen Recherchens

10.02.03

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentplan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Strobel, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | <p>JAKSITS S ET AL: "CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner."</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 NOV 1999, Bd. 163, Nr. 9, 1. November 1999 (1999-11-01), Seiten 4869-4877, XP002217762 ISSN: 0022-1767 Zusammenfassung Seite 4870, linke Spalte, Absatz 2 - Absatz 5 Seite 4871, rechte Spalte -Seite 4875, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 2</p> | 1-22 |
| X | <p>CAUX CHRISTOPHE ET AL: "Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors"</p> <p>JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL, US, Bd. 66, Nr. 5, November 1999 (1999-11), Seiten 781-791, XP001040426 ISSN: 0741-5400 Zusammenfassung Seite 781, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 782, rechte Spalte, Absatz 1 Seite 785, linke Spalte -Seite 787, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 5 Seite 788, linke Spalte, Absatz 3 -Seite 788, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 10</p> | 1-22 |
| X | <p>US 5 811 297 A (GOPAL T VENKAT) 22. September 1998 (1998-09-22) Spalte 3, Absatz 2 -Spalte 4, Absatz 4; Beispiele 6-15</p> | 1-22 |
| X | <p>US 5 648 219 A (MACKAY VIVIAN L ET AL) 15. Juli 1997 (1997-07-15) Spalte 2, Zeile 40 -Seite 47 Spalte 5, Zeile 60 -Seite 8, Zeile 20 Beispiel 6; Tabelle 1</p> | 1-22 |

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|-------------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beitr. Anspruch Nr. |
| X | FAIRCHILD P J ET AL: "Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, Bd. 10, Nr. 23, 30. November 2000 (2000-11-30), Seiten 1515-1518, XP001104013 ISSN: 0960-9822 Zusammenfassung Seite 1515, rechte Spalte; Abbildungen 2,3 Seite 1518, linke Spalte --- | 1-6, 14-16, 18,22 |
| A | PAGLIA P ET AL: "IMMORTALIZED DENDRITIC CELL LINE FULLY COMPETENT IN ANTIGEN PRESENTATION INITIATES PRIMARY T CELL RESPONSES IN VIVO" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, Bd. 178, Nr. 6, 1. Dezember 1993 (1993-12-01), Seiten 1893-1901, XP000572922 ISSN: 0022-1007 Zusammenfassung Seite 1894, linke Spalte, Absatz 5 -Seite 1896, rechte Spalte, Absatz 3 Seite 1898, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 1899, rechte Spalte --- | 1-22 |
| X | BANCHEREAU J ET AL: "IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC, US, Bd. 18, 2000, Seiten 767-811, XP001018258 ISSN: 0732-0582 Seite 788, Absatz 2 -Seite 792, Absatz 2; Abbildung 8 --- | 23,24 |
| A | Seite 770, Absatz 4 -Seite 773, Absatz 1; Abbildung 2 --- | 1-24 |
| X | OZAWA HIROAKI ET AL: "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer to dendritic cells or epidermal cells augments their antigen-presenting function including induction of anti-tumor immunity." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 113, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 999-1005, XP002227119 ISSN: 0022-202X Zusammenfassung Seite 999, linke Spalte -Seite 1000, linke Spalte, Absatz 2 Seite 1004, rechte Spalte, Absatz 3 --- | 23,24 |
| | --- | -/-- |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beiz. Anspruch Nr. |
| P, X | MASTERSON ALLAN J ET AL: "MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors." BLOOD, Bd. 100, Nr. 2, 15. Juli 2002 (2002-07-15), Seiten 701-703, XP002217763 July 15, 2002 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument ----- | 1-22 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
1-24
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCTEP 02 09260

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: INVENTION 1: claims 1-22

Verfahren zur Herstellung von effektiven dendritischen Zellen oder Zelllinien

2. Anspruch : INVENTION 2: claims 23

Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels umfassend ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1-22 und Formulieren des Arzneimittels mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

3. Ansprüche: INVENTION 3: claims 24-56

Verwendung von effektiven dendritischen Zelllinien als Immuntherapeutika/zur Behandlung von Tumor-/Infektions-/Autoimmunerkrankungen

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09260

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5811297 A | 22-09-1998 | CA 2248555 A1 | 12-09-1997 |
| | | EP 0954594 A2 | 10-11-1999 |
| | | JP 2000508885 T | 18-07-2000 |
| | | WO 9732992 A1 | 12-09-1997 |
| US 5648219 A | 15-07-1997 | AU 3586595 A | 27-03-1996 |
| | | CA 2199377 A1 | 14-03-1996 |
| | | EP 0804554 A1 | 05-11-1997 |
| | | JP 10505498 T | 02-06-1998 |
| | | WO 9607733 A1 | 14-03-1996 |
| | | US 5830682 A | 03-11-1998 |